

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 891 332**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/735 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2015 PCT/US2015/050715**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016 WO16044605**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2015 E 15774791 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.07.2021 EP 3194443**

54 Título: **Direccionamiento a células citotóxicas con receptores quiméricos para la inmunoterapia adoptiva**

30 Prioridad:

17.09.2014 WO PCT/CN2014/086694

07.11.2014 WO PCT/CN2014/090578

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

27.01.2022

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH y

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF

PENNSYLVANIA (50.0%)

72 Inventor/es:

ENGELS, BORIS;

IDAMAKANTI, NEERAJA;

JUNE, CARL H.;

LOEW, ANDREAS;

MILONE, MICHAEL C.;

SONG, HUIJUAN;

WANG, ENXIU;

WU, QILONG y

BEATTY, GREGORY

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 891 332 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

Direccionamiento a células citotóxicas con receptores quiméricos para la inmunoterapia adoptiva

ANTECEDENTES

- 5 Con el uso de tecnologías de transferencia de genes, las células T pueden ser modificadas genéticamente para expresar de forma estable dominios de unión a anticuerpos en su superficie que dotan a las células T de especificidades que son independientes de las restricciones impuestas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) representan proteínas sintéticas expresadas en células T (células CART) que fusionan un fragmento de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un scFv, o fragmento de región variable de cadena única) con un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta. Al interactuar con una célula diana que exprese el antígeno afin al scFv, los CARs expresados en las células T pueden desencadenar la activación de las células T, lo que lleva a la destrucción de la célula diana (también denominada lisis de la célula diana). Cuando se combinan con señales coestimuladoras adicionales, como el dominio intracelular de CD137 o CD28, estos receptores también son capaces de generar proliferación. Sin embargo, parte de esta proliferación parece ser independiente del antígeno, a diferencia de las respuestas normales del receptor de células T (TCR) (Milone et al., 2009, Mol Ther 17(8): 1453-64). Los receptores artificiales no reproducen totalmente la transducción de señales intracelulares producida por la unión del TCR natural al péptido antigénico complejado con las moléculas del CMH (Brockner, 2000, Blood 96(5): 1999-2001). Los defectos de señalización pueden limitar la supervivencia a largo plazo de las células CART tras la transferencia adoptiva en ausencia de altos niveles de citoquinas como la IL-2 (Lo et al., 2010, Clin Cancer Res 16(10):2769-80). También tienen una regulación alterada que podría ser beneficiosa en algunas aplicaciones contra el cáncer (Loskog et al., 2006, Leukemia 20(10): 1819-28), pero estos defectos de regulación también conducen a desafíos potenciales para controlar su actividad "fuera del objetivo" contra los tejidos normales que también expresan el antígeno, incluso a niveles extremadamente bajos. Estos efectos "fuera del objetivo" son una grave limitación para las terapias basadas en CAR, y han provocado probables muertes durante la evaluación temprana de la fase I de las células T modificadas con CAR (Morgan et al., 2010, Mol Ther 18(4):843-51).
- 25 El documento Wang et al (2014, Mol Ther 22(S1) S57) describen receptores de antígenos quiméricos (CAR) basados en un receptor similar a la inmunoglobulina asesina (KIR) que se dice que desencadena una actividad citotóxica robusta en tumores sólidos. El documento WO 2014/145252 describe el direccionamiento de las células citotóxicas con receptores quiméricos para la inmunoterapia adoptiva, en la que el CAR se denomina "KIR-CAR". WO 2015/090230 describe los receptores de antígenos quiméricos de mesotelina y sus usos.
- 30 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de enfoques alternativos para construir CARs que superen las limitaciones de las terapias actuales basadas en CARs. La presente invención aborda esta necesidad no satisfecha en la técnica.

SUMARIO

- 35 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico de receptor de función inmune de células asesinas naturales (NKR-CAR), que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a la mesotelina y comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 234 o la SEQ ID NO: 240, el dominio transmembrana de KIR2DS2, y el dominio citoplasmático de KIR2DS2,
- 40 en la que el dominio extracelular de unión a antígeno que se une a la mesotelina está conectado al dominio transmembrana por un dominio de bisagra, en el que el dominio de bisagra se selecciona del grupo que consiste en una bisagra CD8, una bisagra GS, una bisagra IgG4, una bisagra IgD, una bisagra KIR, una bisagra NCR, una bisagra SLAMF, una bisagra FcR y una bisagra LY49,
- en la que el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático comprenden opcionalmente uno o más de un dominio KIR D0, un dominio KIR D1, y/o un dominio KIR D2.
- 45 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido NKR-CAR aislado que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a la mesotelina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 234 o la SEQ ID NO: 240, el dominio transmembrana de KIR2DS2, y el dominio citoplasmático de KIR2DS2,
- 50 en el que el dominio extracelular de unión a antígeno que se une a la mesotelina está conectado al dominio transmembrana por un dominio de bisagra, en el que el dominio de bisagra se selecciona del grupo que consiste en una bisagra CD8, una bisagra GS, una bisagra IgG4, una bisagra IgD, una bisagra KIR, una bisagra NCR, una bisagra SLAMF, una bisagra FcR y una bisagra LY49,
- en el que el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático comprenden opcionalmente uno o más de un dominio KIR D0, un dominio KIR D1, y/o un dominio KIR D2.
- 55 En la molécula de ácido nucleico aislada de la invención o el polipéptido NKR-CAR aislado de la invención:

(a) la molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia líder que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;

(b) el dominio de bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 2, 3 o 4;

5 (c) el dominio de bisagra comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 5 modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 2, 3 o 4;

(d) el dominio de bisagra comprende una secuencia de aminoácidos con un 95-99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 2, 3 o 4; o

10 (e) la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de bisagra comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 356, 16, 13, 14 o 15, o una secuencia de ácido nucleico con un 95-99 % de identidad con la misma; y/o

(f) el NKR-CAR puede ser un KIR-CAR, en el que el dominio extracelular de unión a antígeno que se une a la mesotelina está conectado al dominio transmembrana por un dominio de bisagra, en el que además el dominio de bisagra tiene menos de 50, 20 o 10 aminoácidos de longitud.

15 La molécula de ácido nucleico aislada la invención puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula adaptadora que comprende un dominio de señalización funcional de DAP12 o del receptor Fc épsilon gamma (FcεRγ), opcionalmente en la que:

(a) dicha secuencia de ácido nucleico

i) codifica una molécula adaptadora que comprende la secuencia de aminoácidos 1-113 de la SEQ ID NO: 333 o los aminoácidos 1-86 de la SEQ ID NO: 335;

20 ii) codifica una molécula adaptadora que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones en los aminoácidos 1-113 de la SEQ ID NO: 333 o los aminoácidos 1-86 de la SEQ ID NO: 335;

25 iii) codifica una molécula adaptadora que comprende una secuencia de aminoácidos con un 95-99 % de identidad con los aminoácidos 1-113 de la SEQ ID NO: 333 o los aminoácidos 1-86 de la SEQ ID NO: 335; o

iv) comprende los nucleótidos 1-339 de la SEQ ID NO: 332 o los nucleótidos 1-258 de la SEQ ID NO: 334; y/o

30 (b) la molécula de ácido nucleico aislada comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión peptídica seleccionado del grupo que consiste en T2A, P2A, E2A y F2A, y en la que el ácido nucleico que codifica el sitio de escisión peptídica une la secuencia de ácido nucleico que codifica el NKR-CAR a la secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula adaptadora, opcionalmente en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica el sitio de escisión peptídica codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57, 58, 59 o 60; o una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia del 95-99 % con la misma.

Según la invención,

35 i) el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático pueden comprender colectivamente:

(a) la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 413-487 de la SEQ ID NO: 333;

(b) una secuencia de aminoácidos que tenga al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones en los aminoácidos 413-487 de la SEQ ID NO: 333; o

40 (c) una secuencia de aminoácidos con un 95-99 % de identidad con los aminoácidos 413-487 de la SEQ ID NO: 333; o

ii) la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático puede comprender los nucleótidos 1237-1464 de la SEQ ID NO: 332, o una secuencia que tenga un 95-99 % de identidad con la misma.

45 Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un complejo NKR-CAR, que comprende un NKR-CAR codificado por la molécula de ácido nucleico del primer aspecto de la invención o el polipéptido NKR-CAR del segundo o tercer aspecto de la invención y una molécula adaptadora que es DAP12 o FcεRγ, opcionalmente en la que el NKR-CAR interactúa con la molécula adaptadora al unirse el dominio de unión a antígeno extracelular del NKR-CAR a la mesotelina.

50 Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico del primer aspecto de la invención, en el que el vector es un vector de ADN o un vector de ARN, opcionalmente en el que

(i) el vector se selecciona del grupo formado por un plásmido, un vector lentiviral, un vector adenoviral y un vector retroviral; y/o

(ii) el vector comprende además un promotor EF-1 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 11.

5 Según un sexto aspecto de la invención, se proporciona una célula efectora inmunitaria que comprende la molécula de ácido nucleico del primer aspecto de la invención, el polipéptido NKR-CAR del segundo o tercer aspecto de la invención, el vector del quinto aspecto de la invención, o el complejo NKR-CAR del cuarto aspecto de la invención, opcionalmente en el que la célula es una célula citotóxica, por ejemplo, una célula T o una célula NK.

10 Según un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de fabricación de una célula efectora inmunitaria, que comprende introducir en la célula efectora inmunitaria la molécula de ácido nucleico del primer aspecto de la invención o el vector del quinto aspecto de la invención.

15 Según un octavo aspecto de la invención, se proporciona una célula efectora inmunitaria de la invención para su uso como medicamento. La célula puede utilizarse en un procedimiento de tratamiento de un tumor en un mamífero, en el que las células deben administrarse en una cantidad suficiente para proporcionar inmunidad antitumoral en el mamífero. El tumor puede seleccionarse del grupo que consiste en mesotelioma, mesotelioma pleural maligno, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células escamosas, cáncer de pulmón de células grandes, cáncer de páncreas, adenocarcinoma ductal pancreático, metástasis pancreáticas, cáncer de ovario, cáncer colorrectal y cáncer de vejiga, o cualquier combinación de los mismos.

20 Además, la divulgación presenta un procedimiento para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la administración al mamífero de una cantidad eficaz de una célula que comprende al menos dos KIR-CARs, donde el primer KIR-CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un KIR activador o fragmento del mismo y el segundo KIR-CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un KIR inhibidor o fragmento del mismo. En una realización, el dominio de unión a antígeno en el primer KIR-CAR es específico para un antígeno presente en un tumor, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, en la Tabla 4, y el dominio de unión a antígeno en el segundo KIR-CAR es específico para un antígeno presente en una célula normal, controlando así la actividad fuera del objetivo de la célula. En una realización, la célula es una célula T.

30 La divulgación también presenta un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral descrito en el presente documento (por ejemplo, una enfermedad proliferativa, una afección precancerosa y una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión de un antígeno tumoral) que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula que comprende al menos dos KIR-CAR, en la que el primer KIR-CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un KIR activador o fragmento del mismo y el segundo KIR-CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un KIR inhibidor o fragmento del mismo. En una realización, el primer KIR-CAR comprende un dominio de unión a antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, en la Tabla 4.

35 En este contexto, la enfermedad asociada a la expresión de un antígeno tumoral es típicamente el cáncer, por ejemplo, un cáncer descrito en el presente documento. En una realización, el cáncer es un tumor sólido, por ejemplo, un tumor sólido descrito en el presente documento, por ejemplo, mesotelioma (por ejemplo, mesotelioma pleural maligno), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células escamosas o cáncer de pulmón de células grandes), cáncer de páncreas (por ejemplo, adenocarcinoma ductal pancreático), cáncer de ovario, cáncer colorrectal y cáncer de vejiga o cualquier combinación de los mismos. En una realización, la enfermedad es cáncer de páncreas, por ejemplo, adenocarcinoma ductal pancreático (PDA) metastásico, por ejemplo, en un sujeto que ha progresado con al menos una terapia estándar anterior. En una realización, la enfermedad es un mesotelioma (por ejemplo, mesotelioma pleural maligno), por ejemplo, en un sujeto que ha progresado con al menos una terapia estándar anterior. En una realización, la enfermedad es cáncer de ovario, por ejemplo, cáncer de ovario epitelial seroso, por ejemplo, en un sujeto que ha progresado después de al menos un régimen previo de terapia estándar.

40 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con experiencia normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o en las pruebas de la presente invención pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Los títulos, subtítulos o elementos numerados o con letras, por ejemplo, (a), (b), (i), etc., se presentan simplemente para facilitar la lectura. El uso de títulos o elementos numerados o con letras en este documento no requiere que los pasos o elementos se realicen en orden alfabético o que los pasos o elementos sean necesariamente discretos entre sí.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos las realizaciones que se prefieren actualmente. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

5 La Figura 1, que comprende las Figuras 1A y 1B, es una serie de esquemas que muestran la estructura de los KIR inhibidores y activadores naturales (Figura 1A) y un KIR-CAR activador basado en scFv (Figura 1B).

La Figura 2 es una representación esquemática del vector lentiviral utilizado para suministrar un CAR basado en KIR activador en combinación con la molécula de señalización DAP12.

10 La Figura 3 es una imagen que demuestra que un actKIR-CAR específico para la mesotelina puede expresarse eficazmente en la superficie de células T humanas primarias. Las células T humanas fueron estimuladas con microperlas anti-CD3/anti-CD28 y transducidas con el CAR indicado o transducidas de forma simulada y expandidas *ex vivo*. La expresión se detectó utilizando una IgG policlonal específica de F(ab)2 de cabra anti-ratón biotinilada (Jackson Immunologics), seguida de una tinción con estreptavidina-PE.

15 La Figura 4 demuestra que las células T que expresan el SS1 actKIR-CAR mostraron una actividad citotóxica hacia las células diana K562 diseñadas para expresar el ligando de mesotelina (KT-meso). Las células T humanas fueron estimuladas con microperlas anti-CD3/anti-CD28, transducidas con el CAR indicado o transducidas de forma simulada y expandidas *ex vivo*. 10⁵ células K562 marcadas con CFSE que expresan mesotelina (KT-meso) o K562 de control de tipo salvaje se incubaron con relaciones variables de células T que expresan CAR durante 16 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. A continuación, las células diana K562 se enumeraron mediante citometría de flujo utilizando perlas countbright y una tinción de viabilidad (7AAD). El porcentaje de células K562 lisadas (porcentaje de lisis) se calculó restando el número de células diana viables que quedaban después de la incubación con células T efectoras del número de K562 viables que quedaban después de un cultivo de una noche sin células T efectoras, y dividiéndolo por el número de K562 viables que quedaban después de un cultivo de una noche sin células T efectoras.

25 La Figura 5, que comprende las Figuras 5A y 5B, es una serie de esquemas que muestran un KIR CAR activador en el que se ha eliminado la bisagra KIR2DS2 (KIR2S CAR). Basado en el modelo de segregación cinética de la activación del TCR diagramado en la Figura 5A, se cree que el KIR CAR SS1 específico de mesotelina tiene una bisagra que es demasiado larga para permitir una segregación apropiada. Por lo tanto, se cree que hacer la bisagra KIR CAR específica de mesotelina más corta mejora la función. La Figura 5B es un esquema que muestra que el SS1 scFv se fusionó con el dominio transmembrana de KIR sin los dos dominios tipo Ig de KIR2DS2 como bisagra.

30 La Figura 6, que comprende las Figuras 6A y 6B, es una serie de imágenes que demuestran que el CAR KIRS2 basado en SS1 scFv exhibe una mayor actividad citolítica hacia las células diana que expresan mesotelina en comparación con el CAR formado por la fusión del SS1 scFv en el KIR2DS2 de longitud completa. Se estimularon células T humanas primarias con microperlas CD3/28, seguidas de la transducción lentiviral con el KIR-CAR activador SS1-KIR2DS2, el KIR CAR activador SS1-KIRS2 o el CAR SS1-zeta. Como control se utilizaron simulacros de células T no transducidas (NTD). Las células T se expandieron hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento. La expresión superficial de los CARs específicos de SS1 se determinó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal específico F(ab)2 de cabra biotinilado seguido de la detección con estreptavidina-PE, como se muestra en la Figura 6A. Como se muestra en la Figura 6B, las células diana K562 con o sin mesotelina y teñidas con CFSE se mezclaron con las células T efectoras caracterizadas en la Figura 6A, como se indica, utilizando relaciones variables de células T efectoras a diana que van de 10:1 a 1:1. La lisis de las células K562 diana se evaluó mediante citometría de flujo para determinar el % de células CFSE+ viables, como se describe en la Figura 4. Los datos mostrados son el porcentaje calculado de lisis de las células diana en comparación con las células diana sin células efectoras.

35 La Figura 7, que comprende las Figuras 7A y 7B, es una serie de imágenes que muestran la coexpresión del CD19 actKIR-CAR y el SS1 inhKIR-CAR. Las células Jurkat reporteras de NFAT-GFP fueron transducidas con el KIR CAR indicado o no transducidas (NTD) y mezcladas 1:1 con las células diana con o sin los antígenos CD19 y mesotelina según se indica. Los resultados muestran la expresión de GFP a las 24 horas de la mezcla de células Jurkat y Target (Figura 7A). La Figura 7B muestra la expresión de superficie de los idiotipos mesotelina y CD19 determinada por la tinción con una proteína de fusión mesotelina-Fc y un anticuerpo monoclonal específico para el idiotype FMC63 anti-CD 19 scFv.

40 La Figura 8, que comprende las Figuras 8A, 8B y 8C, es una serie de imágenes que demuestran la coexpresión de PD-1 de tipo salvaje con un CAR basado en KIR activador o un CAR basado en TCR-zeta direccionado a la mesotelina. Se estimularon células T humanas primarias con microperlas CD3/28, seguidas de transducción lentiviral con el CAR KIR activador SS1-KIRS2 o el CAR SS1-zeta. Como control negativo se utilizaron células simuladas no transducidas (NTD). Las células T se expandieron durante 9 días, y la expresión de CAR de superficie se determinó mediante tinción con mesotelina-Fc seguida de un anticuerpo específico Fc de cabra antihumano conjugado con PE (Figura 8A). Las líneas celulares K562 (de tipo salvaje

[wt], que expresan mesotelina [meso] o que coexpresan mesotelina y PD-L1 [meso-PDL1]) se tiñeron con el anticuerpo monoclonal específico contra la mesotelina CAK1 para confirmar la expresión de mesotelina en las dianas (Figura 8B). Las células T humanas primarias transducidas como se muestra en la Figura 8A fueron electroporadas con 10 ug de ARN transcrito *in vitro* que codifica la PD1 de tipo salvaje utilizando un electroporador BTX ECM830 (PD1+) o una transfección simulada (PD1-). La expresión superficial de PD-1 se expresó utilizando un monoclonal anti-PDI conjugado con APC (Figura 8C).

La Figura 9 es una imagen que demuestra que la combinación de la coexpresión de PD-1 de tipo salvaje con un CAR basado en KIR activador y un CAR basado en TCR-zeta direccionado a la mesotelina condujo a la inhibición dependiente del ligando 1 de PDL-1 de la citotoxicidad de KIR-CAR activador específico de la mesotelina. Se estimularon células T humanas primarias con microperlas CD3/28, seguidas de la transducción lentiviral con el CAR KIR activador SS1-KIRS2, el CAR SS1-zeta o la transducción simulada (NTD). Las células T se expandieron durante 9 días seguidos de la electroporación de 5×10^6 células T con 10 ug de ARN transcrito *in vitro* que codifica la PD1 de tipo salvaje utilizando un electroporador BTX ECM830 (PD1+) o una transfección simulada (PD1-). Se determinó la expresión de superficie de los CAR específicos de SS1 y PD-1, como se muestra en la Figura 8. Las células diana K562 sin mesotelina o que expresan mesotelina con o sin PDL-1 se mezclaron con las diferentes condiciones de las células T como se indica, utilizando relaciones variables de células T efectoras a diana de 30:1 a 1:1 como se muestra. La lisis de las células K562 diana se evaluó mediante un procedimiento de tinción con calceína AM para cuantificar las células viables restantes tras 4 horas de incubación. Los datos mostrados son el porcentaje calculado de lisis de las células diana en comparación con las células diana sin células efectoras.

La Figura 10 es una imagen que demuestra la producción de interferón-gamma (IFN- γ) e interleucina-2 por parte de las células T de un donante que expresa un CAR basado en KIR activador específico de mesotelina (SS1-KIRS2) o un CAR basado en TCR-zeta con o sin un dominio coestimulador (SS1-z, SS1-28z o SS1-BBz). Se simulon células T humanas primarias, seguidas de la transducción lentiviral con el CAR KIR activador indicado o el CAR basado en TCR-zeta. Tras la expansión, las células T transducidas se mezclaron con células K562 (Kwt) o K562-mesotelina (Kmeso) en una relación de 2:1. Se determinaron las concentraciones de citoquinas en los sobrenadantes tras 24 horas de estimulación mediante ELISA para las citoquinas indicadas en múltiples donantes independientes. El ANOVA de medidas repetidas demostró un efecto significativo del CAR sobre el IFN- γ ($p=0,002$) y la IL-2 ($p=0,0156$). SS1-KIRS2/DAP12 (SS1KIR) frente a un simulacro de IFN- γ (prueba t pareada posthoc, $p = 0,0162$). SS1-KIR frente a SS1-28z para la IL-2 (prueba t pareada post-hoc, $p=0,0408$)

La Figura 11 es un mapa de calor de las concentraciones de citoquinas en los sobrenadantes, evaluadas por un inmunoensayo múltiple basado en Luminex (Cytokine Human 10-Plex Panel, Life Technologies). Se generó un mapa de calor de la concentración relativa después de la normalización a través del donante y las condiciones a la concentración más baja para cada citoquina utilizando el paquete de mapa de calor implementado en el software estadístico R.

La Figura 12, que comprende las Figuras 12A-12B, representa la construcción de una célula T de ingeniería basada en el receptor de antígeno quimérico (KIR-CAR) específico de mesotelina con una actividad citotóxica robusta. Se estimularon células T humanas primarias con microperlas CD3/28, seguidas de la transducción con un vector lentiviral que expresaba GFP y dsRed (Control) o DAP12 y dsRed (DAP12). Las células se expandieron *ex vivo* hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento. 5×10^6 células T de cada población transducida fueron electroporadas con 10 ug de ARN transcrito *in vitro* que codifica SS1-KIRS2 utilizando un electroporador BTX ECM830. La expresión tanto de dsRed como de SS1-KIRS2 se evaluó por citometría de flujo con la detección de SS1-KIRS2 utilizando un anticuerpo policlonal específico F(ab) $_2$ de cabra biotilado seguido de estreptavidina-PE. El panel superior de la Figura 12A muestra la estrategia de gating para la identificación de las células T que expresan dsRed, que luego fueron analizadas para la expresión de SS1-KIRS2 como se muestra en la parte inferior del panel. La Figura 12B muestra la capacidad de las células caracterizadas en la Figura 12A para mediar la citotoxicidad contra las células K562 de tipo salvaje (K562-wt) o las células K562 que expresan mesotelina (K562-mesotelina), tal como se evaluó mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr durante 4 horas.

La Figura 13 muestra que la expresión de un TCR endógeno no se ve afectada por la expresión de SS1-KIRS2 y DAP12. Se electroporaron 5×10^6 células T humanas primarias con 10 ug de ARN transcrito *in vitro* que codificaba SS1-KIRS2 o con una transfección simulada utilizando un electroporador BTX ECM830. Tras la incubación de una noche, las células T transfectadas se tiñeron para la expresión de SS1-KIRS2 utilizando un anticuerpo policlonal específico F(ab) $_2$ de cabra biotilado seguido de estreptavidina-PE. La expresión de V β 13.1 se evaluó utilizando un anticuerpo monoclonal conjugado con PE específico para esta cadena V β del TCR.

La Figura 14 ilustra la capacidad de un CAR basado en KIR específico de mesotelina (SS1-KIRS2) para estimular la proliferación de células T que es dependiente del antígeno pero independiente de la coestimulación adicional de CD28. Se estimularon células T humanas primarias con microperlas CD3/28, seguidas de la transducción lentiviral de SS1-KIRS2 y DAP12 o del CAR TCR-zeta específico de mesotelina

(SS1-zeta). Como control negativo se utilizaron células simuladas no transducidas (NTD). Las células diana K562 sin mesotelina (K562 wt) o que expresan mesotelina (K562-mesotelina) se mezclaron con las diferentes condiciones de las células T como se indica en una relación de 2:1 de células T efectoras a células diana. Las células T estimuladas con K562-mesotelina se dividieron además en una condición con o sin un anticuerpo monoclonal agonista anti-CD28 (clon 9.3) a 1 ug/mL. El número de células T viables se enumeró mediante citometría de flujo utilizando el recuento basado en perlas en los puntos de tiempo indicados para calcular el número de duplicaciones de la población tras la estimulación del antígeno.

La Figura 15, que comprende las Figuras 15A, 15B, 15C, 15D y 15E, demuestra que las células T modificadas con KIR-CAR específicos de mesotelina muestran una mayor actividad antitumoral *in vivo* en comparación con los CAR basados en TCR- ζ de segunda generación que llevan dominios coestimuladores CD28 o CD137 (4-1BB). La Figura 15A muestra un experimento en el que se implantaron por vía subcutánea a ratones NOD-SCID- $\gamma_c^{-/-}$ (NSG) 2×10^6 células derivadas de mesotelioma que expresaban mesotelina (células EM-meso). 20 días después de la implantación del tumor, cada animal fue inyectado por vía intravenosa con 5×10^6 células T que fueron estimuladas con perlas estimuladoras anti-CD3/anti-CD28, seguidas de la transducción lentiviral con una serie de CAR basados en CD3 ζ con o sin un dominio coestimulador (SS1- ζ , SS1-BB ζ y SS1-28 ζ) o los CAR basados en KIR específicos para la mesotelina, SS1-KIRS2 con DAP12. Como control se utilizaron células T transducidas simuladas (NTD). El volumen del tumor se midió con un calibrador en los momentos indicados ($n = 7$ ratones por grupo). La Figura 15B muestra que la actividad *in vivo* del KIR-CAR es independiente del injerto de células T en sangre, bazo o tumor. La frecuencia de células T humanas CD45+ se evaluó al final del experimento mediante citometría de flujo, y los datos se expresan como porcentaje del total de células viables en la sangre, el bazo y el digerido del tumor. La Figura 15C muestra que se observaron frecuencias comparables de TILs CD3+ en los grupos tratados con células T CAR SS1-28 ζ y SS1-KIRS2/DAP12. Se utilizó el mismo modelo que se muestra en la Figura 15A. La frecuencia de linfocitos humanos CD3+ en los tumores en el día 30 (10 días después de la infusión de CAR T) se evaluó mediante citometría de flujo. La Figura 15D muestra que las células T modificadas con DAP12 requieren el CAR basado en KIR específico de mesotelina para la erradicación del tumor. Se utilizó el mismo modelo que se muestra en la Figura 15A. Se inyectaron por vía intravenosa 4 millones de células T que expresaban DAP12 y dsRed (DAP12), SS1-28 ζ o SS1-KIRS2 y DAP12 (SS1-KIRS2) en el día 20, y se evaluó el volumen del tumor a lo largo del tiempo mediante la medición con calibrador. La flecha indica el momento del aislamiento de los TIL utilizados para el análisis funcional y fenotípico. La Figura 15E muestra la actividad citotóxica específica de antígeno de los TILs aislados de los ratones descritos en la Figura 15D. La citotoxicidad específica del antígeno se evaluó mediante el cocultivo con células EM-meso que expresan luciferasa de luciérnaga o células EMP (células EM parentales que carecen de expresión de mesotelina) en las relaciones E:T indicadas durante 18 horas.

La Figura 16, que comprende las Figuras 16A y 16B, demuestra que un CAR basado en KIR con especificidad CD19 puede desencadenar la citotoxicidad de la célula diana específica del antígeno. Tras la activación de perlas anti-CD3/anti-CD28, las células T fueron transducidas con un vector lentiviral bicistrónico que expresaba DAP12 junto con un CAR basado en KIR específico para CD19 en el que el scFv derivado de FMC63 se fusionaba con KIR2DS2 de longitud completa (CD19-KIR2DS2) o un CAR basado en KIR generado mediante la fusión del scFv de FMC63 con el dominio transmembrana y citoplásmico de KIR2DS2 a través de un enlazador corto [Gly]₄-Ser(CD19-KIRS2). Las células T transducidas se cultivaron hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento, y la expresión del CAR basado en KIR específico para CD19 se evaluó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal F(ab)₂ de cabra anti-ratón biotinilado seguido de SA-PE. Se mezclaron células diana K562 marcadas con ⁵¹Cr con (K562-CD19) o sin (K562-wt) expresión de CD19 en relaciones variables con células T y células diana (relación E:T). La citotoxicidad se determinó midiendo la fracción de ⁵¹Cr liberada en el sobrenadante a las 4 horas. También se incluyeron células T de control que fueron transducidas de forma simulada (NTD) o transducidas con un CAR basado en CD3 ζ específico para CD19 (CD19-z) como controles negativos y positivos, respectivamente.

La Figura 17, que comprende las Figuras 17A y 17B, muestra la actividad *in vivo* de CD19-KIRS2. A los ratones NOD-SCID- $\gamma_c^{-/-}$ (NSG) se les injertó por vía intravenosa en la vena de la cola, el día 0, 1 millón de células tumorales Nalm-6 CBG, una línea celular leucémica que expresa CD19. Las células T se estimularon con perlas estimuladoras anti-CD3/anti-CD28, seguidas de transducción lentiviral en el día 1 con una serie de CAR basados en CD3 ζ específicos para CD19 con o sin dominio coestimulador (CD19z, 19BBz) o los CAR basados en KIR específicos para CD19, CD19-KIRS2 con DAP12 (19KIRS2). Como control se utilizaron simulacros de células T no transducidas (NTD). Las células T se expandieron hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento *ex vivo* y se inyectaron por vía intravenosa el día 5 después de la inyección de la línea celular leucémica con 2 millones de células T CAR por ratón. La carga tumoral se evaluó mediante imágenes bioluminiscentes. Se analizaron 5 animales para cada condición de células T. La Figura 17A muestra el flujo de fotones bioluminiscente individual para animales individuales en el día 5 (línea de base antes de la inyección de células T) y en el día 15 después del injerto de células leucémicas. La Figura 17B muestra la mediana del flujo total para cada grupo de tratamiento a lo largo del tiempo.

La Figura 18 demuestra que un CAR NCR basado en NKp46 con especificidad de mesotelina desencadena citotoxicidad específica de antígeno. Tras la activación de perlas anti-CD3/anti-CD28, las células T fueron

transducidas con un vector lentiviral bi-cistrónico que expresaba DAP12 y SS1-KIRS2 (control), o FcεRγ y un CAR basado en NKp46 específico para la mesotelina (SS1-NKp46) o FcεRγ y un CAR NKp46 específico para la mesotelina en el que el dominio extracelular natural de NKp46 estaba truncado (SS1-TNKp46). La expresión de los CARs específicos de mesotelina se evaluó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal F(ab)2 de cabra anti ratón biotinilado seguido de SA-PE como se muestra en la Figura 18A. Las células T se mezclaron con células diana K562 marcadas con ⁵¹Cr que expresaban mesotelina en relaciones variables de células T efectoras y células K562 diana (relación E:T). La citotoxicidad se determinó midiendo la fracción de ⁵¹Cr liberada en el sobrenadante a las 4 horas en comparación con la liberación espontánea, como se muestra en la Figura 18B.

La Figura 19 muestra una representación esquemática de los receptores utilizados en los experimentos mostrados en las Figuras 21-23.

La Figura 20 demuestra la generación y caracterización de una línea celular K562-meso que expresa el ligando HLA-Cw de KIR2DL3. Las células K562 (K562) o las células K562 que expresan mesotelina (K562-meso) fueron transducidas con el alelo HLA-Cw3 seguido de una clasificación celular activada por fluorescencia para obtener células K562 que expresan HLA-Cw con (K562-meso-HLACw) o sin (K562-HLACw) expresión de mesotelina. La expresión de HLA-Cw3 se evaluó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal conjugado con APC que reconoce los alelos HLA-A, B y C (clon W6/32).

La Figura 21 demuestra la coexpresión de SS1-KIRS2 y KIR2DL3 en células T humanas primarias. Se estimularon células T humanas primarias con microperlas CD3/28 seguidas de transducción lentiviral con SS1-KIRS2 y DAP12 (SS1-KIRS2) o transducción simulada (NTD) en combinación con KIR2DL3 de tipo salvaje. Las células T se expandieron hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento. La expresión superficial del CAR específico de mesotelina y de KIR2DL3 se determinó mediante tinción con mesotelina-Fc seguida de Fc antihumano de cabra conjugado con PE y un anticuerpo monoclonal contra el ectodominio de KIR2DL3.

La Figura 22 demuestra que KIR2DL3 coexpresado con un KIR CAR puede suprimir la citotoxicidad específica del antígeno en presencia de HLA-Cw en las células diana. Las células T que se generaron y caracterizaron como se describe en la Figura 21 se mezclaron con células K562 marcadas con ⁵¹Cr que se generaron y caracterizaron como se describe en la Figura 22. La citotoxicidad se determinó midiendo la fracción de ⁵¹Cr liberada en el sobrenadante a las 4 horas en comparación con las células diana sin células efectoras.

La Figura 23 muestra una representación esquemática de los receptores utilizados en los experimentos mostrados en la Figura 24.

La Figura 24 demuestra la incapacidad de coexpresar dos receptores quiméricos basados en scFv en la superficie de la célula T conservando la respectiva especificidad de unión de cada receptor. Se transducen células T Jurkat utilizando un vector lentiviral que codifica SS1-KIR2DL3. Posteriormente, estas células se transducen con un segundo vector lentiviral que codifica CD19-KIR2DS2 a distintas diluciones del vector. La expresión del scFv específico del SS1 se evaluó utilizando mesotelina-Fc seguido de Fc antihumano de cabra conjugado con PE. La expresión del scFv específico de CD19 se evaluó utilizando un anticuerpo monoclonal conjugado con PE específico del idiotipo FMC63.

La Figura 25 son imágenes que demuestran que la expresión de un CAR específico de CD19 también redujo la expresión de sitios de unión a mesotelina en la superficie de las células que coexpresan un CAR de fusión SS1-zetamCherry. Se estimularon células T humanas primarias con microperlas CD3/28, seguidas de la transducción lentiviral con un SS1 scFv zeta CAR con una fusión C-terminal de mCherry (SS1z-mCh) o el CAR 41BB-zeta específico para CD19 derivado de FMC63 (19bbz) solo o combinado. Como control se utilizaron células transducidas simuladas. Las células T se expandieron hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento, y se determinó el dsRed así como la expresión de CAR de superficie mediante citometría de flujo tras la tinción con mesotelina-Fc seguida de un anticuerpo policlonal específico anti-Fc de cabra conjugado con FITC.

La Figura 26 son imágenes que demuestran que la expresión mutuamente exclusiva de los sitios de unión para el scFv SS1 no es exclusiva del scFv FMC63. Se estimularon células T humanas primarias con microperlas CD3/28, seguidas de la transducción lentiviral con un SS1 scFv zeta CAR o varios CARs 41BB-zeta específicos de CD19 (19BBz [FMC63 scFv, 214d scFv o los CARs BL22 scFv con orientaciones VH y VL alternas [H2L y L2H]). NTD representa las células transducidas simuladas utilizadas como control de tinción. Además, un conjunto separado de células T fue cotransducido con el SS1 scFv zeta CAR y los diferentes CARs específicos de CD19 como se mencionó anteriormente. Las células T se expandieron hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento, y la expresión de CAR de superficie se determinó mediante tinción con proteína L biotinilada (reconoce la cadena ligera kappa) seguida de estreptavidina APC simultáneamente con mesotelina-Fc seguida de un anticuerpo policlonal específico anti-fc de cabra conjugado con PE. Las células cotransductoras mostraron que la expresión mutuamente excluyente observada con los CAR basados en FMC63 también se observa con otros scFv-CAR..

La Figura 27, que comprende las Figuras 27A y 27B, representa el mecanismo putativo para la pérdida de unión de scFv cuando dos moléculas de scFv se coexpresan en la superficie celular (Figura 27A) y la evitación putativa de esta interacción cuando un CAR basado en el dominio VHH único de camélidos se expresa en una superficie de células T en combinación con un CAR basado en scFv.

5 La Figura 28 demuestra que un CAR basado en un dominio VHH de camélido puede expresarse en la superficie de una célula T en combinación con un CAR basado en scFv sin una interacción apreciable con el receptor. Las células T Jurkat que expresan GFP bajo un promotor dependiente de NFAT (NF-GFP) fueron transducidas con un CAR activador específico de mesotelina (SS1-CAR), activador específico de CD19 (19-CAR) o un CAR generado utilizando un dominio VHH de camélido específico de EGFR (VHH-CAR). Tras la transducción con el CAR activador, las células se transducen con un CAR inhibidor adicional que reconoce CD19 (19-PD1) para generar células que coexpresen tanto el CAR activador como el inhibidor (SS1+19PD1, 10 19+19PD1 o VHH+19PD1). Las células T Jurkat transducidas se co-cultivaron durante 24 horas con diferentes líneas celulares que o bien 1) carecen de todos los antígenos diana (K562), 2) expresan mesotelina (K-meso), CD19 (K-19) o EGFR (A431) solamente, 3) expresan una combinación de EGFR y mesotelina (A431-mesotelina) o CD19 (A431-CD19) o 4) expresan una combinación de CD19 y mesotelina (K-19/meso). También se incluyeron condiciones adicionales que incluían células no estimuladoras (no stim) o K562 con 1 ug/mL de OKT3 (OKT3) como controles negativos y positivos para la activación de NFAT, respectivamente. La expresión de GFP, como marcador de la activación de NFAT, se evaluó mediante citometría de flujo.

20 La Figura 29 muestra una anotación de la secuencia KIR2DS2. La secuencia de nucleótidos proporcionada en la Figura 29 se designa como SEQ ID NO: 342. La secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 29 se designa como SEQ ID NO: 343.

La Figura 30 muestra una anotación de la secuencia KIR2DL3. La secuencia de nucleótidos proporcionada en la Figura 30 se designa como SEQ ID NO: 344. La secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 30 se designa como SEQ ID NO: 345.

25 La Figura 31 muestra una anotación de la secuencia NKp46. La secuencia de nucleótidos proporcionada en la Figura 31 se designa como SEQ ID NO: 346. La secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 31 se designa como SEQ ID NO: 347.

30 La Figura 32 muestra una anotación de la secuencia SS1-KIRS2. La secuencia de nucleótidos proporcionada en la Figura 32 se designa como SEQ ID NO: 348. La secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 32 se designa como SEQ ID NO: 349.

La Figura 33 muestra una anotación de la secuencia SS1-KIR2DS2. La secuencia de nucleótidos proporcionada en la Figura 33 se designa como SEQ ID NO: 350. La secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 33 se designa como SEQ ID NO: 351.

35 La Figura 34 muestra una anotación de la secuencia SS1-tNKp46. La secuencia de nucleótidos proporcionada en la Figura 34 se designa como SEQ ID NO: 352. La secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 34 se designa como SEQ ID NO: 353.

La Figura 35 muestra una anotación de la secuencia SS1-KIRL3. La secuencia de nucleótidos proporcionada en la Figura 35 se designa como SEQ ID NO: 354. La secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 35 se designa como SEQ ID NO: 355.

40 La Figura 36 muestra que los CARs específicos de mesotelina CD3 ζ y los basados en KIR tienen una citotoxicidad *in vitro* específica del antígeno hacia las células derivadas del mesotelioma que expresan mesotelina (células EM-meso). Se estimularon células T humanas primarias con perlas estimuladoras anti-CD3/CD28 y se transdujeron con un vector lentiviral que expresaba el CAR específico de mesotelina SS1-KIRS2. Tras la expansión, las células T se mezclaron con células K562 marcadas con ⁵¹Cr que expresaban EM-meso en la relación indicada de efector a diana (E:T). Se determinó el % de lisis.

45 La Figura 37 muestra que los TILs de ratones tratados con 28 ζ CART perdieron la secreción de IFN γ con la estimulación con células derivadas de mesotelioma que expresan mesotelina (células EM-meso). Los ratones NOD-SCID - γ c -/- (NSG) fueron inyectados por vía subcutánea con 2x10⁶ células EM-meso. 5x10⁶ células T humanas primarias transducidas con el CAR indicado se inyectaron por vía intravenosa el día 16. 18 días después de la infusión de células T CAR, se aislaron las TIL con perlas magnéticas CD45 y se mezclaron con EM-meso en la relación indicada de efector a diana (E:T). Las concentraciones de citoquinas se determinaron en los sobrenadantes mediante ELISA.

50 La Figura 38 muestra que las células T SS1-KIRS2/DAP12 median una sólida actividad antitumoral *in vivo*. Los ratones NOD-SCID - γ c -/- (NSG) fueron inyectados por vía subcutánea con 2x10⁶ células derivadas de mesotelioma que expresaban mesotelina (células EM-meso). 5x10⁶ células T humanas primarias transducidas con el CAR indicado se inyectaron por vía intravenosa el día 20. El volumen del tumor se midió con un calibrador en los momentos indicados.

La Figura 39, que comprende las Figuras 39A, 39B y 39C, es un esquema que muestra la estructura de los CAR específicos de mesotelina. La Figura 39A representa un KIR-CAR multicadena específico de mesotelina. La Figura 39B representa un KIR-CAR de cadena única específico para la mesotelina que contiene DAP12. La Figura 39C representa un CAR específico de mesotelina que contiene dominios de señalización CD28 y CD3zeta.

La Figura 40 muestra la actividad antitumoral *in vivo* de los constructos CAR basados en mesotelina, incluyendo los constructos KIRS/DAP12 de cadena múltiple y DAP12 de cadena única.

La Figura 41 muestra la expresión superficial de KIR-CAR basada en mesotelina en células T primarias humanas, detectada mediante análisis de citometría de flujo.

La Figura 42, que comprende las Figuras 42A y 42B, muestra la actividad citotóxica específica de antígeno de los KIR-CARs basados en mesotelina para células diana que no expresan mesotelina (K562) (Fig. 42A) o células diana diseñadas para expresar mesotelina (K562-meso) (Fig. 42B)

La Figura 43, que comprende las Figuras 43A y 43B, muestra la producción de citoquinas de los KIR-CARs basados en mesotelina cuando se cultivan en presencia de células diana que expresan mesotelina (K562-meso, barras negras) o células diana de control que no expresan mesotelina (K562, barras vacías). La Figura 43A muestra la producción de IFN-gamma; la Figura 43B muestra la producción de citoquinas IL-2.

La Figura 44, que comprende las Figuras 44A, 44B, 44C, 44D y 44E, muestra las diversas configuraciones en un solo vector, por ejemplo, donde el ARNhc regulado por U6 está aguas arriba o aguas abajo de los elementos de codificación de CAR regulados por EF1 alfa. En los constructos ejemplares representados en la Fig. 44A y 44B, la transcripción se produce a través de los promotores U6 y EF1 alfa en la misma dirección. En los constructos ejemplares representados en la Fig. 44C y 44D, la transcripción se produce a través de los promotores U6 y EF1 alfa en diferentes direcciones. En la Figura 44E, el ARNhc (y el correspondiente promotor U6) está en un primer vector, y el CAR (y el correspondiente promotor EF1 alfa) está en un segundo vector.

La Figura 45 representa las estructuras de dos configuraciones RCAR ejemplares. Los miembros de unión a antígeno comprenden un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de conmutación. Los miembros de unión intracelular comprenden un dominio de conmutación, un dominio de señalización coestimuladora y un dominio de señalización primaria. Las dos configuraciones demuestran que el primer y segundo dominios de conmutación descritos en el presente documento pueden estar en diferentes orientaciones con respecto al miembro de unión al antígeno y al miembro de unión intracelular. En el presente documento se describen otras configuraciones de RCAR.

La Figura 46 muestra que la proliferación de células T transducidas que expresan CAR se ve potenciada por dosis bajas de RAD001 en un sistema de cultivo celular. Los CARTs fueron co-cultivados con células Nalm-6 en presencia de diferentes concentraciones de RAD001. Se evaluó el número de células T CD3 positivas para CAR (negro) y el total de células T (gris) tras 4 días de cocultivo.

La Figura 47 muestra las mediciones del crecimiento tumoral de las células NALM6-luc con la dosificación diaria de RAD001 a 0,3, 1, 3 y 10 mg/kg (mpk) o con la dosificación del vehículo. Los círculos denotan el vehículo; los cuadrados denotan la dosis de 10 mg/kg de RAD001; los triángulos denotan la dosis de 3 mg/kg de RAD001; los triángulos invertidos denotan la dosis de 1 mg/kg de RAD001; y los diamantes denotan la dosis de 0,3 mg/kg de RAD001.

La Figura 48, que comprende las Figuras 48A y 48B, muestra las curvas farmacocinéticas que indican la cantidad de RAD001 en la sangre de ratones NSG con tumores NALM6. La FIG. 48A muestra la PK del día 0 después de la primera dosis de RAD001. La FIG. 48B muestra la PK del día 14 tras la última dosis de RAD001. Los diamantes denotan la dosis de 10 mg/kg de RAD001; los cuadrados denotan la dosis de 1 mg/kg de RAD001; los triángulos denotan la dosis de 3 mg/kg de RAD001; y las x denotan la dosis de 10 mg/kg de RAD001.

La Figura 49, que comprende las Figuras 49A y 49B, muestra la proliferación *in vivo* de las células CD19 CART humanizadas con y sin la dosificación de RAD001. Dosis bajas de RAD001 (0,003 mg/kg) diarias conducen a un aumento de la proliferación de células T CAR, por encima del nivel normal de proliferación huCAR19. FIG. 49A muestra las células T CD4+ CAR; la FIG. 49B muestra las células T CD8+ CAR. Los círculos indican PBS; los cuadrados indican huCTL019; los triángulos indican huCTL019 con 3 mg/kg de RAD001; los triángulos invertidos indican huCTL019 con 0,3 mg/kg de RAD001; los diamantes indican huCTL019 con 0,03 mg/kg de RAD001; y los círculos indican huCTL019 con 0,003 mg/kg de RAD001.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para regular la especificidad y la actividad de las células T, u otras células citotóxicas, por ejemplo, las células NK. La información técnica que se expone a continuación puede ir en algunos aspectos más allá de la divulgación de la invención, que se define exclusivamente

por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para situar la invención real en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Esta información técnica adicional que no entra en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas, no forma parte de la invención.

5 En un aspecto de la divulgación, se proporciona un receptor de antígeno quimérico (un CAR), por ejemplo, un CAR de receptor de células NK (un NKR-CAR) basado en un receptor de células NK (un NKR), por ejemplo, un KIR-CAR, un NCR-CAR, un SLAMF-CAR, un FcR-CAR o un Ly49-CAR. La divulgación proporciona un tipo de receptor de antígeno quimérico (CAR) en el que el CAR se denomina NKR, por ejemplo, un "KIR-CAR", que es un diseño de CAR que comprende un componente de un receptor que se encuentra en las células asesinas naturales (NK). En la divulgación, el receptor NK incluye, pero no se limita, a un receptor tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR).
10 Los KIR pueden funcionar como KIR activadores o KIR inhibidores.

Una ventaja de los NKR-CARs, por ejemplo, KIR-CARs, de la divulgación es que un NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR, proporciona un procedimiento para regular la especificidad de la célula citotóxica, por ejemplo, la célula T, para controlar la actividad fuera del objetivo de la célula T diseñada. En algunos casos, los KIR-CAR de la divulgación no requieren una costimulación para proliferar.

15 Los NKR-CARs pueden suministrar una señal a través de una proteína adaptadora, por ejemplo, una proteína adaptadora que contiene ITAM. En una realización, los KIR-CARs de la divulgación comprenden un KIR activador que suministra su señal a través de una interacción con la proteína de membrana que contiene un motivo de activación basado en la inmutotribosina (ITAM), DAP12 que está mediada por residuos dentro de los dominios transmembrana de estas proteínas.

20 En la divulgación, un NKR-CAR puede suministrar una señal inhibitoria por medio de un motivo inhibidor. Los KIR-CARs de la divulgación comprenden un KIR inhibidor que suministra su señal a través de una interacción con los motivos inhibidores basados en inmutotribosina (ITIMs). Los KIR con dominios citoplasmáticos que contienen ITIMs anulan la señal de activación, lo que conduce a la inhibición de la actividad citolítica y productora de citoquinas de las NK. Sin embargo, la divulgación no debe limitarse a los KIR inhibidores. Más bien, cualquier proteína inhibidora que tenga un dominio citoplásmico que se asocie con una señal inhibitoria puede utilizarse en la construcción de los CAR de la divulgación.
25

En consecuencia, la divulgación proporciona una composición que comprende un NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR, vectores que comprenden el mismo, composiciones que comprenden un NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR, vectores empaquetados en partículas virales, y células T recombinantes u otras células citotóxicas que comprenden un NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR. La divulgación también incluye procedimientos para hacer una célula T modificada genéticamente u otra célula citotóxica, por ejemplo, una célula NK, o una célula NK cultivada, por ejemplo, una célula NK92, que expresa un NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR (KIR-CART), en el que el NKR-CAR expresado, por ejemplo, un KIR-CAR, comprende un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con una molécula de señalización intracelular de un NKR, por ejemplo, un KIR. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de señalización intracelular incluye, pero no se limita a, un KIR ITAM, un KIR ITIM, y similares.
30
35

En consecuencia, la divulgación proporciona composiciones y procedimientos para regular la especificidad y la actividad de las células T u otras células citotóxicas modificadas para expresar un NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR. La presente divulgación también proporciona células que comprenden una pluralidad de tipos de NKR-CAR, por ejemplo, KIR-CAR (por ejemplo, NKR-CAR activadores, por ejemplo, KIR-CAR y NKR-CAR inhibidores, por ejemplo, un KIR-CAR), en las que la pluralidad de tipos de NKR-CAR, por ejemplo, KIR-CAR, participan en la señalización para regular la activación de células T. Es beneficioso controlar y regular eficazmente las células citotóxicas NKR-CAR, por ejemplo, las células T KIR-CAR, de manera que maten a las células tumorales sin afectar a las células secundarias normales. La presente divulgación también proporciona procedimientos para eliminar las células cancerosas minimizando el agotamiento de las células normales no cancerosas, mejorando así la especificidad de una terapia NKR-CAR, por ejemplo, una KIR-CAR.
40
45

El enfoque NKR-CAR, por ejemplo, KIR-CAR, incluye la separación física de una pluralidad de tipos de CARs expresados en una célula, en la que se requiere la unión de una pluralidad de tipos de NKR-CARs, por ejemplo, KIR-CARs, a su antígeno diana para la activación de células citotóxicas NKR-CAR, por ejemplo, células T KIR-CAR. Por ejemplo, en el enfoque KIR-CAR, cada KIR-CAR de la pluralidad de tipos de KIR-CAR tiene un dominio de señalización intracelular diferente. Por ejemplo, cuando se utiliza una pluralidad de tipos de KIR-CARs para inducir la activación de células T KIR-CAR, el primer tipo de KIR-CARs sólo puede comprender un dominio intracelular de un KIR activador y el segundo tipo de CAR sólo puede comprender un dominio intracelular de un KIR inhibidor. De este modo, se genera una activación condicional de las células T mediante el acoplamiento del KIR-CAR activador (actKIR-CAR) a un antígeno en una célula maligna de interés. Un KIR-CAR inhibidor (inhKIR-CAR) con un dominio de unión a antígeno dirigido contra un antígeno presente en una célula normal, pero no maligna, amortigua los efectos activadores del actKIR-CAR cuando la célula T se encuentra con células normales.
50
55

La presente divulgación describe una célula T u otra célula citotóxica diseñada para expresar al menos dos NKR-CAR, por ejemplo, al menos dos KIR-CAR, donde el primer NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR, es un actNKR-CAR, por ejemplo, un actKIR-CAR, y el segundo NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR, es un inhNKR-CAR, por ejemplo, un inhKIR-CAR. La divulgación proporciona un inhNKR-CAR, por ejemplo, un inhKIR-CAR, en el que la unión del inhNKR-
60

CAR, por ejemplo, un inhKIR-CAR, a una célula normal resulta en la inhibición de la célula citotóxica, por ejemplo, la inhibición de la actividad de las células T KIR-CAR. La unión del inhNKR-CAR, por ejemplo, un inhKIR-CAR, a un antígeno asociado a una célula no cancerosa provoca la muerte de la célula citotóxica NKR-CAR, por ejemplo, una célula T KIR-CAR.

- 5 Un inhNKR-CAR, por ejemplo, un actKIR-CAR, de la divulgación puede utilizarse en combinación con CARs existentes para regular la actividad de los CARs. Se han descrito ejemplos de CARs en WO 2012/079000.

También se ha descubierto que, en las células que tienen una pluralidad de receptores quiméricos embebidos en la membrana que comprenden un dominio de unión a antígeno (CMERs), las interacciones entre el dominio de unión a antígeno de los CMERs pueden ser indeseables, por ejemplo, porque la interacción inhibe la capacidad de uno o más de los dominios de unión a antígeno para unirse a su antígeno cognado o podría generar nuevos sitios de unión con antígeno cognado desconocido. En consecuencia, se divulgan en el presente documento células que tienen un primer y un segundo CMER no naturales en los que los dominios de unión a antígenos minimizan dichas interacciones. También se divulgan en el presente documento los ácidos nucleicos que codifican un primer y un segundo CMER de origen no natural, así como los procedimientos de fabricación y uso de dichas células y ácidos nucleicos. El dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros y segundos CMER no naturales, comprende un scFv, y el otro comprende un dominio VH simple, por ejemplo, un dominio VH simple de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio VH simple derivado de una secuencia humana o de ratón o un andamio no anticuerpo.

DEFINICIONES

20 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona con experiencia normal en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede utilizarse en la práctica y/o para las pruebas de la presente invención, los materiales y procedimientos preferidos se describen en el presente documento. En la descripción y reivindicación de la presente invención, se utilizará la siguiente terminología según se defina, cuando se proporcione una definición.

25 También debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene por objeto describir únicamente las realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa.

Los artículos "un" y "uno, una" se utilizan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (*es decir*, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

30 "Aproximadamente", tal y como se utiliza en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que abarca variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, en algunos casos $\pm 5\%$, en algunos casos $\pm 1\%$, y en algunos casos $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos divulgados.

35 El término "molécula adaptadora", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido con una secuencia que permite la interacción con dos o más moléculas y, en las realizaciones, promueve la activación o inactivación de una célula citotóxica. Por ejemplo, en el caso de DAP12, esto comprende interacciones con un KIR activador a través de interacciones de carga dentro del dominio transmembrana e interacciones con moléculas de señalización como ZAP70 o Syk a través de una secuencia ITAM fosforilada dentro del dominio citoplásmico.

40 El término "antígeno" o "Ag", tal como se utiliza en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos, la activación de células específicas inmunológicamente competentes, o ambas. La persona experimentada entenderá que cualquier macromolécula, incluyendo prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Además, los antígenos pueden derivarse de ADN recombinante o genómico. Una persona experimentada entenderá que cualquier ADN que comprenda una secuencia de nucleótidos o una secuencia parcial de nucleótidos que codifique una proteína que provoque una respuesta inmunitaria codifica, por lo tanto, un "antígeno" tal como se utiliza este término en el presente documento. Además, un experto en la materia entenderá que un antígeno no necesita estar codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es evidente que la presente invención incluye, pero no se limita a, el uso de secuencias parciales de nucleótidos de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en varias combinaciones para codificar polipéptidos que provocan la respuesta inmunitaria deseada. Además, una persona experimentada entenderá que no es necesario que un antígeno esté codificado por un "gen" en absoluto. Es evidente que un antígeno puede generarse sintetizado o puede derivarse de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero no se limita a una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

55 El término "efecto antitumoral", tal y como se utiliza en este documento, se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por una disminución del volumen del tumor, una disminución del número de células tumorales, una disminución del número de metástasis, un aumento de la esperanza de vida o una mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados a la enfermedad cancerosa. Un "efecto antitumoral" también puede manifestarse por la

capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la invención en la prevención de la aparición del tumor en primer lugar.

5 El término "aféresis", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un proceso extracorpóreo por el cual la sangre de un donante o paciente se extrae del donante o paciente y se hace pasar por un aparato que separa uno o varios constituyentes particulares seleccionados y devuelve el resto a la circulación del donante o paciente, por ejemplo, mediante una retransfusión. Así, en el contexto de "una muestra de aféresis" se refiere a una muestra obtenida mediante aféresis.

10 El término "autoantígeno" significa, de acuerdo con la presente invención, cualquier autoantígeno que es reconocido por el sistema inmunitario como si fuera extraño. Los auto-antígenos comprenden, pero no se limitan a, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de la superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glicoproteínas, incluyendo receptores de la superficie celular.

15 El término "enfermedad autoinmune", tal como se utiliza en el presente documento, se define como un trastorno que resulta de una respuesta autoinmune. Una enfermedad autoinmune es el resultado de una respuesta inapropiada y excesiva a un antígeno propio. Algunos ejemplos de enfermedades autoinmunes son, entre otros, la enfermedad de Addison, la alopecia areata, la espondilitis anquilosante, la hepatitis autoinmune, la parotitis autoinmune, la enfermedad de Crohn, la diabetes (tipo I), la epidermólisis bullosa distrófica, la epididimitis, la glomerulonefritis, la enfermedad de Graves, el síndrome de Guillain-Barré, la enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitíligo, mixedema, anemia perniciosa, colitis ulcerosa, entre otras.

20 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que posteriormente se le va a reintroducir.

25 El término "alogénico", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se introduce el material. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes de uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser lo suficientemente diferente genéticamente como para interactuar antigénicamente. Alogénico se refiere a un injerto derivado de un animal diferente de la misma especie.

30 "Receptor de antígeno quimérico": o "CAR", tal como se utiliza ese término en el presente documento, se refiere a un polipéptido quimérico que comparte propiedades estructurales y funcionales con un receptor de función inmunitaria celular o una molécula adaptadora, de, por ejemplo, una célula T o una célula NK. Los CARs incluyen los TCARs y los NKR-CARs. En las realizaciones, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno afín, por ejemplo, un antígeno tumoral descrito en el presente documento. Al unirse al antígeno afín, un CAR puede activar o inactivar la célula citotóxica en la que está dispuesto, o modular la actividad antitumoral de la célula o modular de otro modo la respuesta inmunitaria de la misma.

35 Opcionalmente, los dominios en el constructo polipeptídico CAR están en la misma cadena polipeptídica, por ejemplo, comprenden una proteína de fusión quimérica. Opcionalmente, los dominios en el constructo polipeptídico CAR no son contiguos entre sí, por ejemplo, están en diferentes cadenas polipeptídicas, por ejemplo, como se proporciona en un RCAR como se describe en el presente documento.

40 "Receptor de la función inmunitaria de las células asesinas naturales - receptor de antígeno quimérico" o "NKR-CAR", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un CAR que comparte propiedades funcionales y estructurales con un receptor de la función inmunitaria de las células asesinas naturales (NKR) o una molécula adaptadora de una célula NK. En las realizaciones, un NKR-CAR comprende dos o todos los dominios de unión a antígeno, un dominio transmembrana, por ejemplo, un dominio transmembrana NKR, y/o un dominio citoplásmico, por ejemplo, un dominio citoplásmico NKR.

45 "Receptor de antígeno quimérico Fc" o "FcR-CAR", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un CAR que comparte propiedades funcionales y estructurales con un receptor Fc (FcR). "Receptor quimérico de antígenos similar a la inmunoglobulina de células asesinas" o "KIR-CAR", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un CAR que comparte propiedades funcionales y estructurales con un receptor similar a la inmunoglobulina de células asesinas (KIR).

50 "Receptor Ly49 - Receptor de antígeno quimérico" o "Ly49-CAR", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un CAR que comparte propiedades funcionales y estructurales con un receptor de Ly49 (Ly49).

"Receptor de citotoxicidad natural-receptor de antígeno quimérico" o "NCR-CAR", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un CAR que comparte propiedades funcionales y estructurales con un receptor de citotoxicidad natural (NCR).

55 "Receptor de antígeno quimérico de la familia de la molécula de activación de linfocitos señalizadora" o "SLAM-CAR", o "SLAMF-CAR", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un CAR que comparte propiedades funcionales y estructurales con un SLAM o un SLAMF

"Receptor de antígeno quimérico basado en células T" o "TCAR", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un CAR que comparte propiedades funcionales y estructurales con un receptor de función inmunitaria celular o una molécula adaptadora de una célula T. En las realizaciones, un TCAR comprende un dominio antigénico, un dominio de señalización intracelular primario y, opcionalmente, uno o más dominios de señalización coestimuladora.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína o secuencia polipeptídica derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno diana. Un anticuerpo puede ser una inmunoglobulina intacta derivada de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y puede ser una porción inmunorreactiva de una inmunoglobulina intacta. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, de cadena múltiple o única, o inmunoglobulinas intactas, y pueden proceder de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos suelen ser tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. La molécula de anticuerpo descrita en el presente documento puede existir en una variedad de formas en las que la porción de unión al antígeno del anticuerpo se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua incluyendo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena única (scFv) y un anticuerpo humanizado o humano, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a por lo menos una porción de un anticuerpo intacto, o variantes recombinantes del mismo, y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto que es suficiente para conferir reconocimiento y unión específica del fragmento de anticuerpo a una diana, como un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, un anticuerpo de dominio de cadena única (sdAb), fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv, fragmentos de anticuerpos scFv, un anticuerpo lineal, un anticuerpo de dominio único como un sdAb (ya sea VL o VH) un dominio VHH de camélidos, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos como un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, y un CDR aislado u otros fragmentos de unión a epítopos de un anticuerpo. Un fragmento de unión a antígeno también puede incorporarse a anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diabodies, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de unión a antígenos también pueden injertarse en andamios basados en polipéptidos como la fibronectina tipo III (Fn3) (véase Patente de EE.UU. nº: 6,703,199 que describe minicuerpos de polipéptidos de fibronectina).

El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, en la que las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada están unidas contiguamente a través de un enlazador polipeptídico corto y flexible, y que puede expresarse como un polipéptido de cadena única, y en la que el scFv conserva la especificidad del anticuerpo intacto del que se deriva. A menos que se especifique, tal como se utiliza en el presente documento, un scFv puede tener las regiones variables VL y VH en cualquier orden, por ejemplo, con respecto a los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, el scFv puede comprender VL-enlazador-VH o puede comprender VH-enlazador-VL.

El término "región determinante de la complementariedad" o "CDR", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de los anticuerpos que confieren especificidad y afinidad de unión al antígeno. Por ejemplo, en general, hay tres CDR en cada región variable de la cadena pesada (por ejemplo, HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres CDR en cada región variable de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3). Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada pueden determinarse utilizando cualquiera de los esquemas conocidos, incluidos los descritos por Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) *JMB* 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia"), o una combinación de ellos. Según el esquema de numeración de Kabat, en algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos CDR en el dominio variable de la cadena pesada (VH) se numeran 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos CDR en el dominio variable de la cadena ligera (VL) se numeran 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), y 89-97 (LCDR3). Según el esquema de numeración de Chothia, en algunas realizaciones, los aminoácidos CDR en la VH se numeran 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2), y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos CDR en la VL se numeran 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2), y 91-96 (LCDR3). En un esquema de numeración combinado de Kabat y Chothia, en algunas realizaciones, las CDRs corresponden a los residuos de aminoácidos que forman parte de una CDR de Kabat, una CDR de Chothia, o ambas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las CDRs corresponden a los residuos de aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), y 95-102 (HCDR3) en un VH, por ejemplo, un VH de mamífero, por ejemplo, un VH humano; y los residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), y 89-97 (LCDR3) en un VL, por ejemplo, un VL de mamífero, por ejemplo, un VL humano.

La porción de la composición de CAR de la divulgación que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo puede existir en una variedad de formas en las que el dominio de unión a antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua, incluyendo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena única (scFv) y un anticuerpo humanizado o humano (Harlow et al., 1999, In: *Uso de anticuerpos: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY Harlow et al., 1989, En: *Anticuerpos: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883;

Bird et al., 1988, Science 242:423-426). Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno de una composición de CAR de la divulgación comprende un fragmento de anticuerpo. Opcionalmente, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" (también denominado en el presente documento "dominio de unión a la antiobjetivo (por ejemplo, mesotelina)") se refiere a una proteína, por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina o un fragmento de la misma, que comprende al menos una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. El término "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" abarca los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos. En una realización, una molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífica, por ejemplo, comprende una pluralidad de secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, en la que una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un primer epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad para no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo.

Una "cadena pesada de anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales.

20 Una "cadena ligera de anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al menor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales. Las cadenas ligeras κ y λ se refieren a los dos isotipos principales de cadena ligera de anticuerpo.

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

30 El término "cáncer", tal y como se utiliza en el presente documento, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden propagarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Ejemplos de varios tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de ovario, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de piel, el cáncer de páncreas, el cáncer colorrectal, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de cerebro, el linfoma, la leucemia, el cáncer de pulmón, el glioma, y similares. Los términos "tumor" y "cáncer" se utilizan indistintamente en el presente documento, por ejemplo, ambos términos abarcan tumores sólidos y líquidos, por ejemplo, difusos o circulantes. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" o "tumor" incluye los cánceres y tumores premalignos y malignos.

40 El término "combinación" se refiere a una combinación fija en una forma de unidad de dosificación, o a una administración combinada en la que un compuesto de la presente divulgación y un socio de la combinación (por ejemplo, otro fármaco como se explica más adelante, también denominado "agente terapéutico" o "coagente") pueden administrarse independientemente al mismo tiempo o por separado en intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los socios de la combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico. Los componentes individuales pueden estar empaquetados en un kit o por separado. Uno o ambos componentes (por ejemplo, polvos o líquidos) pueden reconstituirse o diluirse hasta la dosis deseada antes de su administración. Los términos "coadministración" o "administración combinada" o similares, tal y como se utilizan en el presente documento, pretenden abarcar la administración de la pareja combinada seleccionada a un único sujeto que la necesite (por ejemplo, un paciente), y pretenden incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes no se administran necesariamente por la misma vía de administración o al mismo tiempo. El término "combinación farmacéutica", tal como se utiliza en el presente documento, significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un ingrediente activo e incluye combinaciones fijas y no fijas de los ingredientes activos. El término "combinación fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto de la presente divulgación y un compañero de combinación, se administran simultáneamente a un paciente en forma de una sola entidad o dosis. El término "combinación no fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto de la presente divulgación y un compañero de combinación, se administran a un paciente como entidades separadas, ya sea de forma simultánea, concurrente o secuencial, sin límites de tiempo específicos, en los que dicha administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Esto último también se aplica a la terapia de cóctel, por ejemplo, la administración de tres o más ingredientes activos.

60 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "modificaciones conservadoras de la secuencia" pretende referirse a las modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión

del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Estas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en un anticuerpo de la divulgación mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquellas en las que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido con una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos con cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la divulgación pueden ser sustituidos por otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado puede ser probado para la capacidad de unirse a FR β utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se enlaza de forma operativa con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula bajo la mayoría o todas las condiciones fisiológicas de la misma.

Los términos citoplásmico e intracelular, aplicados a las moléculas adaptadoras y a los dominios de señalización, se utilizan indistintamente en el presente documento.

"Derivado de", tal y como se utiliza este término en el presente documento, indica una relación entre una primera y una segunda molécula. En general, se refiere a la similitud estructural entre la primera molécula y una segunda molécula y no connota ni incluye una limitación de proceso o de origen en una primera molécula que se deriva de una segunda molécula. Por ejemplo, en el caso de un dominio de señalización intracelular derivado de una molécula CD3zeta, el dominio de señalización intracelular conserva una estructura CD3zeta suficiente para que tenga la función requerida, es decir, la capacidad de generar una señal en las condiciones adecuadas. No connota ni incluye una limitación a un proceso particular de producción del dominio de señalización intracelular, por ejemplo, no significa que, para proporcionar el dominio de señalización intracelular, se deba comenzar con una secuencia CD3zeta y eliminar la secuencia no deseada, o imponer mutaciones, para llegar al dominio de señalización intracelular.

El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando afín, mediando así un evento de transducción de señales, como, pero sin limitarse a ello, la transducción de señales a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, como la regulación a la baja del TGF- β , y/o la reorganización de las estructuras citoesqueléticas, y similares.

El término "molécula estimuladora" se refiere a una molécula expresada por una célula T que proporciona la(s) secuencia(s) de señalización citoplásmica primaria que regula(n) la activación primaria del complejo TCR de forma estimuladora para al menos algún aspecto de la vía de señalización de las células T. En un aspecto, la señal primaria se inicia, por ejemplo, mediante la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula MHC cargada con un péptido, y que conduce a la mediación de una respuesta de células T, incluyendo, pero sin limitarse a, la proliferación, la activación, la diferenciación, y similares. Una secuencia de señalización citoplásmica primaria (también denominada "dominio de señalización primaria") que actúa de forma estimulante puede contener un motivo de señalización que se conoce como motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora o ITAM. Los ejemplos de una secuencia de señalización citoplásmica primaria que contiene ITAM que es de uso particular en la divulgación incluyen, pero no se limitan a, los derivados de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (también conocido como "ICOS"), Fc ϵ RI, CD66d, DAP10 y DAP12. En un CAR específico de la divulgación, el dominio de señalización intracelular en uno o más CARS de la divulgación comprende una secuencia de señalización intracelular, por ejemplo, una secuencia de señalización primaria de CD3-zeta. En un CAR específico de la divulgación, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO:9, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares. En un CAR específico de la divulgación, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 10, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares.

El término "célula presentadora de antígeno" o "APC" se refiere a una célula del sistema inmunitario, como una célula accesoria (por ejemplo, una célula B, una célula dendrítica, y similares) que muestra un antígeno extraño complejo con complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Las células T pueden reconocer estos complejos mediante sus receptores de células T (TCR). Las APC procesan los antígenos y los presentan a las células T.

Un "dominio de señalización intracelular", tal como se utiliza el término en el presente documento, se refiere a una porción intracelular de una molécula. El dominio de señalización intracelular puede generar una señal que promueva una función efectora inmunitaria de la célula que contiene CAR, por ejemplo, una célula CART o una célula NK que exprese CAR. Los ejemplos de la función efectora inmunitaria, por ejemplo, en una célula CART o una célula NK que

expresen CAR, incluyen la actividad citolítica y la actividad auxiliar, incluida la secreción de citoquinas. El dominio de la señal intracelular transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula a realizar una función especializada. Aunque se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar toda la cadena. En la medida en que se utilice una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede utilizarse en lugar de la cadena intacta siempre que transduce la señal de la función efectora. El término dominio de señalización intracelular incluye, por tanto, cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario. Los dominios de señalización intracelular primaria ejemplares incluyen los derivados de las moléculas responsables de la estimulación primaria, o la simulación dependiente de antígenos. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio intracelular coestimulador. Los dominios de señalización intracelular costimulatoria ejemplares incluyen los derivados de las moléculas responsables de las señales costimulatorias, o de la estimulación independiente del antígeno. Por ejemplo, en el caso de una célula efectora inmunitaria que exprese CAR, por ejemplo, una célula CART o una célula NK que exprese CAR, un dominio de señalización intracelular primario puede comprender una secuencia citoplásmica de un receptor de células T, y un dominio de señalización intracelular coestimulador puede comprender una secuencia citoplásmica de un coreceptor o una molécula coestimuladora.

Un dominio de señalización intracelular primario puede comprender un motivo de señalización que se conoce como motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplásmica primaria incluyen, pero no se limitan a, los derivados de CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"), FcεRI, CD66d, DAP10 y DAP12.

El término "zeta" o alternativamente "cadena zeta", "CD3-zeta" o "TCR-zeta" se define como la proteína proporcionada como GenBank Acc. No. BAG36664.1, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares, y un "dominio estimulante zeta" o alternativamente un "dominio estimulante CD3-zeta" o un "dominio estimulante TCR-zeta" se define como los residuos de aminoácidos del dominio citoplásmico de la cadena zeta que son suficientes para transmitir funcionalmente una señal inicial necesaria para la activación de las células T. En un aspecto, el dominio citoplásmico de zeta comprende los residuos 52 a 164 del GenBank Acc. BAG36664.1 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares, que son ortólogos funcionales del mismo. En un aspecto, el "dominio estimulador zeta" o un "dominio estimulador CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO:9. En un aspecto, el "dominio estimulador zeta" o un "dominio estimulador CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 10.

El término "molécula coestimuladora" se refiere a la pareja de unión afín en una célula T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando así una respuesta coestimuladora por parte de la célula T, como, por ejemplo, la proliferación. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que son necesarias para una respuesta inmunitaria eficaz. Las moléculas coestimuladoras incluyen, entre otras, una molécula MHC de clase I, proteínas receptoras del TNF, proteínas similares a la inmunoglobulina, receptores de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores de células NK activadoras, BTLA un receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, y un ligando que se une específicamente con CD83.

Un dominio de señalización intracelular coestimulador se refiere a la porción intracelular de una molécula coestimuladora. El dominio de señalización intracelular puede comprender toda la porción intracelular, o todo el dominio de señalización intracelular nativo, de la molécula de la que se deriva, o un fragmento funcional de la misma.

El término "4-1BB" se refiere a un miembro de la superfamilia TNFR con una secuencia de aminoácidos proporcionada como GenBank Acc. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares; y un "dominio coestimulador 4-1BB" se define como los residuos de aminoácidos 214-255 del GenBank Acc. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares. En un aspecto, el "dominio coestimulador 4-1BB" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO:7 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares.

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

- 5 "Función de efector inmunitario o respuesta de efector inmunitario", tal como se utiliza ese término en el presente documento, se refiere a la función o respuesta, por ejemplo, de una célula de efector inmunitario, que mejora o promueve un ataque inmunitario de una célula diana. Por ejemplo, una función o respuesta inmunitaria efectoras se refiere a una propiedad de una célula T o NK que promueve la muerte o la inhibición del crecimiento o la proliferación, de una célula diana. En el caso de una célula T, la estimulación primaria y la coestimulación son ejemplos de función o respuesta inmunitaria efectoras.
- El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o la actividad auxiliar, incluida la secreción de citoquinas.
- 10 El término "codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, como un gen, un ADNc o un ARNm, de servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (*es decir*, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes. Así, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la del ARNm y que suele proporcionarse en listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden denominarse como codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.
- 15 A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas unas de otras y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.
- 20 Los términos "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se utilizan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, como se describe en el presente documento, efectiva para lograr un resultado biológico particular. Dichos resultados pueden incluir, pero no se limitan a, la inhibición de la infección por el virus como se determina por cualquier medio adecuado en la técnica.
- 25 Tal y como se utiliza en el presente documento, "endógeno" se refiere a cualquier material procedente o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.
- Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido desde o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.
- El término "expresión", tal y como se utiliza en el presente documento, se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular impulsada por su promotor.
- 30 El término "expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular impulsada por un promotor.
- El término "vector de transferencia" se refiere a una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede utilizarse para suministrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados a compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Así, el término "vector de transferencia" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. El término también debe interpretarse para incluir además compuestos no plasmídicos y no virales que facilitan la transferencia del ácido nucleico a las células, como, por ejemplo, un compuesto de polilisina, un liposoma y similares. Los ejemplos de vectores de transferencia viral incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales y similares.
- 35 El "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante con secuencias de control de la expresión enlazadas operativamente a una secuencia de nucleótidos que debe expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula huésped o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.
- 40 El término "vector", tal y como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier vehículo que pueda utilizarse para suministrar y/o expresar una molécula de ácido nucleico. Puede ser un vector de transferencia o un vector de expresión como se describe en el presente documento.
- 45 El término "homólogo" o "identidad", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la identidad de secuencia de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, como, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de la subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; por *ejemplo*, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; por
- 50 *ejemplo*, si la mitad (*por ejemplo*, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones
- 55

en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50 % homólogas; si el 90 % de las posiciones (*por ejemplo*, 9 de 10), son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son 90 % homólogas.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, la rata o el conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (Fv) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden incluir residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar y optimizar el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, de manera óptima, también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525, 1986 Reichmann y otros, *Nature*, 332: 323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Construir. Biología*, 2: 593-596, 1992.

"Totalmente humano" se refiere a una inmunoglobulina, como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, en el que toda la molécula es de origen humano o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo o la inmunoglobulina.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "material instructivo" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda utilizarse para comunicar la utilidad de las composiciones y procedimientos de la divulgación. El material de instrucción del kit de la divulgación puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contenga el ácido nucleico, el péptido y/o la composición de la divulgación o enviarse junto con un recipiente que contenga el ácido nucleico, el péptido y/o la composición. Alternativamente, el material didáctico puede enviarse por separado del contenedor con la intención de que el material didáctico y el compuesto sean utilizados conjuntamente por el destinatario.

El término "aislado" significa alterado o retirado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcial o totalmente de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o una proteína aislados pueden existir en forma sustancialmente purificada, o pueden existir en un entorno no nativo como, por ejemplo, una célula huésped.

En el contexto de la presente divulgación, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que se dan comúnmente. La "A" se refiere a la adenosina, la "C" a la citosina, la "G" a la guanosina, la "T" a la timidina y la "U" a la uridina.

A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas unas de otras y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La secuencia de nucleótidos de la expresión que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones hasta el punto de que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener en alguna versión un intrón o intrones.

Un "lentivirus", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus por su capacidad de infectar células que no se dividen; pueden suministrar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula huésped, por lo que son uno de los procedimientos más eficaces de vector de suministro de genes. El VIH, el VIS y el VIS son ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de lentivirus ofrecen los medios para lograr niveles significativos de transferencia de genes *in vivo*.

El término "vector lentiviral" se refiere a un vector derivado de al menos una porción del genoma de un lentivirus, incluyendo especialmente un vector lentiviral autoinactivable como el proporcionado en Milone et al., *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores lentivirus que pueden utilizarse en la clínica incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la tecnología de administración de genes LENTIVECTOR® de Oxford BioMedica, el sistema de vectores LENTIMAX™ de Lentigen y otros similares. También existen tipos no clínicos de vectores lentivirales que serían conocidos por los expertos en la materia.

El término "enlazador polipeptídico flexible" o "enlazador", tal como se utiliza en el contexto de un scFv, se refiere a un enlazador peptídico que consiste en aminoácidos tales como residuos de glicina y/o serina utilizados solos o en combinación, para enlazar regiones variables de cadena pesada y variable de cadena ligera. En una realización, el enlazador polipeptídico flexible es un enlazador Gly/Ser y comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO: 38), donde n es un número entero positivo igual o mayor que 1. Por ejemplo, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 y n=6, n=7, n=8, n=9 y n=10. En una realización, los enlazadores polipeptídicos flexibles incluyen, pero no se limitan a,

(Gly4 Ser)₄ (SEQ ID NO:27) o (Gly4 Ser)₃ (SEQ ID NO:28). En otra realización, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly2Ser), (GlySer) o (Gly3Ser) (SEQ ID NO:29). También se incluyen en el ámbito de la divulgación los enlazadores descritos en WO2012/138475).

El "receptor de la función inmunitaria de las células NK" o "NKR", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a una proteína transmembrana endógena y natural expresada en las células NK, que puede acoplarse con un ligando en una célula presentadora de antígeno y modular una respuesta de la función inmunitaria de las células NK, por ejemplo, puede modular la actividad citolítica o la secreción de citoquinas de la célula NK. El NKR puede contribuir a la activación (un NKR activador, o actNKR), o a la inhibición (un NKR inhibidor, o inhNKR). Típicamente, un NKR comprende un dominio extracelular de unión al ligando (ECD), un dominio transmembrana (TM) y un dominio citoplasmático intracelular (ICD). Los NKR incluyen la familia de receptores similares a la inmunoglobulina asesina (KIR), como KIR2DS2, la familia de receptores de células NK (NCR), como NKp46 (NCR1), la familia de receptores de activación de linfocitos de señalización (SLAM), como 2B4, y los receptores de unión a Fc, como el receptor de unión a IgG, CD16 (FcγRIII). Los ejemplos de respuestas inmunológicas de las células NK moduladas por los NKR incluyen la eliminación de células diana (a menudo denominada citotoxicidad o citolisis), la secreción de citoquinas y/o la proliferación. Típicamente, un NKR adecuado para su uso en los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento es un NKR humano, (o hNKR). En una realización, también se incluye la familia de receptores Ly49 en *Mus musculus*, que surgió por evolución convergente para proporcionar la misma función que un KIR en las células NK y T murinas.

El término "operativamente enlazado" se refiere al enlazamiento funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que resulta en la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está enlazado operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN enlazadas operablemente son contiguas y, cuando es necesario para unir dos regiones codificadoras de proteínas, en el mismo marco de lectura.

La administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, técnicas de inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, o de infusión.

El término "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico" o "polinucleótido", tal como se utiliza indistintamente en el presente documento, se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos, tal y como se utilizan en el presente documento, son intercambiables. Un experto en la materia tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que pueden ser hidrolizados en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos pueden ser hidrolizados en nucleósidos. Tal como se utilizan en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico a partir de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando la tecnología de clonación ordinaria y PCRTM, y similares, y por medios sintéticos. En las realizaciones, los ácidos nucleicos en el presente documento presentes son ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), o una combinación de ADN o ARN de los mismos, y polímeros de los mismos en forma de cadena simple o doble. El término "ácido nucleico" incluye un gen, un ADNc o un ARNm. En una realización, la molécula de ácido nucleico es sintética (por ejemplo, sintetizada químicamente) o recombinante. A menos que se limite específicamente, el término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos o derivados de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. En concreto, las sustituciones degeneradas de codones pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o de todos) se sustituye por residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991) Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Rossolini et al., *Mol. Celular. Sondas* 8:91-98 (1994)).

Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente, y se refieren a un compuesto formado por residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o un péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se establece ninguna limitación en cuanto al número máximo de aminoácidos que pueden componer la secuencia de una proteína o un péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término se refiere tanto a las cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a las cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica como proteínas, de las que hay muchos tipos. "Los polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de ellos.

El término "promotor", tal como se utiliza en el presente documento, se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o la maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

5 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico unido de forma operativa a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora principal y en otros casos, esta secuencia puede incluir también una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede, por ejemplo, ser una que exprese el producto génico de forma específica para un tejido.

10 Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une de forma operativa a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente sólo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

15 Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une de forma operativa a un polinucleótido que codifica o especifica un gen, hace que el producto del gen se produzca en una célula sustancialmente sólo si la célula es del tipo de tejido

Una "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señales que desempeñan un papel en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. La expresión "receptor de superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitirla a través de la membrana de una célula.

20 El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos).

25 Tal como se utiliza en el presente documento, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que ha sido separada de otros tipos de células con las que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a las células que han sido separadas de las células con las que están asociadas de forma natural en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan *in vitro*. En otras realizaciones, las células no se cultivan *in vitro*.

30 Tal y como se utiliza en el presente documento, una tapa 5' (también denominada tapa de ARN, tapa de 7-metilguanosa de ARN o tapa m7G de ARN) es un nucleótido de guanina modificado que se ha añadido al extremo "frontal" o 5' de un ARN mensajero eucariótico poco después del inicio de la transcripción. La tapa 5' consiste en un grupo terminal que se une al primer nucleótido transcrito. Su presencia es fundamental para el reconocimiento por parte del ribosoma y la protección frente a las RNasas. La adición de tapas está acoplada a la transcripción y se produce de forma co-transcripcional, de manera que cada una influye en la otra. Poco después del inicio de la transcripción, el extremo 5' del ARNm que se está sintetizando es unido por un complejo de sintetización de tapa asociado a la ARN polimerasa. Este complejo enzimático cataliza las reacciones químicas necesarias para la protección del ARNm. La síntesis procede como una reacción bioquímica de varios pasos. La fracción de protección puede modificarse para modular la funcionalidad del ARNm, como su estabilidad o la eficiencia de la traducción.

40 Tal y como se utiliza en el presente documento, "ARN transcrito *in vitro*" se refiere al ARN, preferiblemente ARNm, que ha sido sintetizado *in vitro*. Generalmente, el ARN transcrito *in vitro* se genera a partir de un vector de transcripción *in vitro*. El vector de transcripción *in vitro* comprende una plantilla que se utiliza para generar el ARN transcrito *in vitro*.

45 Tal y como se utiliza en el presente documento, una "poli(A)" es una serie de adenosinas unidas por poliadenilación al ARNm. En la realización preferida de un xonstrcto para la expresión transitoria, el poliA está entre 50 y 5000 (SEQ ID NO: 30), preferiblemente mayor de 64, más preferiblemente mayor de 100, y más preferiblemente mayor de 300 o 400. Las secuencias de poli(A) pueden modificarse química o enzimáticamente para modular la funcionalidad del ARNm, como la localización, la estabilidad o la eficiencia de la traducción.

50 Tal y como se utiliza en el presente documento, la "poliadenilación" se refiere a la unión covalente de una fracción de poliadenilo, o su variante modificada, a una molécula de ARN mensajero. En los organismos eucariotas, la mayoría de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) están poliadeniladas en el extremo 3'. La cola 3' de poli(A) es una larga secuencia de nucleótidos de adenina (a menudo varios centenares) que se añade al pre-ARNm mediante la acción de una enzima, la poliadenilato polimerasa. En los eucariotas superiores, la cola de poli(A) se añade a los transcritos que contienen una secuencia específica, la señal de poliadenilación. La cola de poli(A) y la proteína unida a ella ayudan a proteger el ARNm de la degradación por las exonucleasas. La poliadenilación también es importante para la terminación de la transcripción, la exportación del ARNm del núcleo y la traducción. La poliadenilación se produce en el núcleo inmediatamente después de la transcripción del ADN en ARN, pero también puede producirse posteriormente en el citoplasma. Una vez finalizada la transcripción, la cadena de ARNm se escinde mediante la acción de un complejo de endonucleasas asociado a la ARN polimerasa. El sitio de escisión suele caracterizarse por la presencia de la

secuencia de bases AAUAAA cerca del sitio de escisión. Una vez que el ARNm se ha escindido, se añaden residuos de adenosina al extremo 3' libre en el lugar de la escisión.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "transitorio" se refiere a la expresión de un transgén no integrado durante un periodo de horas, días o semanas, en el que el periodo de tiempo de expresión es menor que el periodo de tiempo de expresión del gen si está integrado en el genoma o contenido dentro de un replicón plasmídico estable en la célula huésped.

El término "terapéutico", tal como se utiliza en el presente documento, significa un tratamiento y/o profilaxis. Un efecto terapéutico se obtiene mediante la supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido", tal y como se utiliza en este documento, se refiere a un proceso mediante el cual se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno en la célula huésped. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es aquella que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula primaria del sujeto y su progenie.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "trato", "tratamiento" y "tratar" se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de un trastorno proliferativo, o a la mejora de uno o más síntomas (preferiblemente, uno o más síntomas discernibles) de un trastorno proliferativo resultante de la administración de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos como un CAR de la invención). En determinadas realizaciones, los términos "trato", "tratamiento" y "tratar" se refieren a la mejora de al menos un parámetro físico medible de un trastorno proliferativo, como el crecimiento de un tumor, no necesariamente perceptible por el paciente. En otras realizaciones, los términos "trato", "tratamiento" y "tratar" se refieren a la inhibición de la progresión de un trastorno proliferativo, ya sea físicamente mediante, por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente mediante, por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico, o ambos. En otras realizaciones los términos "trato", "tratamiento" y "tratar" se refieren a la reducción o estabilización del tamaño del tumor o del recuento de células cancerosas.

El término "profilaxis", tal como se utiliza en el presente documento, significa la prevención o el tratamiento protector de una enfermedad o estado de enfermedad.

El término "antígeno tumoral", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula (típicamente una proteína, un carbohidrato o un lípido) que se expresa en la superficie de una célula cancerosa o tumoral, ya sea en su totalidad o como un fragmento (por ejemplo, MHC/péptido), y que es útil para la orientación preferente de un agente farmacológico a la célula cancerosa o tumoral. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral es un marcador expresado tanto por células normales como por células cancerosas, por ejemplo, un marcador de linaje, por ejemplo, CD19 o CD123 en células B. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral es una molécula de la superficie celular que está sobreexpresada en una célula cancerosa en comparación con una célula normal, por ejemplo, una sobreexpresión de 1 vez, una sobreexpresión de 2 veces, una sobreexpresión de 3 veces o más en comparación con una célula normal. En algunos casos, un antígeno tumoral es una molécula de la superficie celular que se sintetiza de forma inapropiada en la célula cancerosa, por ejemplo, una molécula que contiene supresiones, adiciones o mutaciones en comparación con la molécula expresada en una célula normal. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral se expresará exclusivamente en la superficie celular de una célula cancerosa, en su totalidad o como un fragmento (por ejemplo, MHC/péptido), y no se sintetizará o expresará en la superficie de una célula normal.

Los CAR de la presente divulgación incluyen CAR que comprenden un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo) que se une a un péptido presentado por el MHC. Normalmente, los péptidos derivados de proteínas endógenas llenan los bolsillos de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, y son reconocidos por los receptores de células T (TCR) en los linfocitos T CD8+. Los complejos MHC de clase I se expresan de forma constitutiva en todas las células nucleadas. En el cáncer, los complejos péptido/MHC específicos del virus y/o del tumor representan una clase única de objetivos de la superficie celular para la inmunoterapia. Se han descrito anticuerpos similares al TCR dirigidos a péptidos derivados de antígenos virales o tumorales en el contexto del antígeno leucocitario humano (HLA)-A1 o HLA-A2 (véase, por ejemplo, Sastry et al., J Virol. 2011 85(5): 1935-1942 Sergeeva et al., Blood, 2011 117(16):4262-4272 Verma et al., J Immunol 2010 184(4):2156-2165 Willemsen et al., Gene Ther 2001 8(21) :1601-1608 ; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176) :176ra33 ; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100). Por ejemplo, el anticuerpo similar al TCR puede identificarse a partir del cribado de una biblioteca, como una biblioteca de scFv humana desplegada de fagos.

La expresión "bajo control transcripcional" o "operativamente enlazado", tal como se utiliza en el presente documento, significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede utilizarse para suministrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados a compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Así, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. El término también debe interpretarse para incluir compuestos no plasmídicos y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores

virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales y similares.

5 Por el término "se une específicamente", tal como se utiliza en el presente documento, se entiende un anticuerpo, o un ligando, que reconoce y se une a una proteína asociada de unión afín presente en una muestra, pero cuyo anticuerpo o ligando no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas de la muestra.

Por el término "estimulación", se entiende una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora con su ligando afín, mediando así un evento de transducción de señales, como por ejemplo, pero sin limitarse a la transducción de señales a través del receptor NK apropiado.

"Xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de una especie diferente.

10 El término "se une específicamente" se refiere a un anticuerpo, o un ligando, que reconoce y se une a una proteína de socio de unión afín (por ejemplo, una molécula estimuladora y/o coestimuladora presente en una célula T) presente en una muestra, pero cuyo anticuerpo o ligando no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas de la muestra.

15 "Receptor de antígeno quimérico regulable (RCAR)", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en las realizaciones más sencillas, que cuando están en una célula efectora inmunitaria, proporcionan a la célula especificidad para una célula diana, típicamente una célula cancerosa, y con generación de señales intracelulares regulables. Un RCAR comprende al menos un dominio extracelular de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico de señalización (también denominado en el presente documento "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado
20 de una molécula estimuladora y/o una molécula coestimuladora como se define en el presente documento en el contexto de una molécula CAR. El conjunto de polipéptidos en el RCAR no son contiguos entre sí, por ejemplo, están en diferentes cadenas polipeptídicas. El RCAR incluye un conmutador de dimerización que, en presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, por ejemplo, puede acoplar un dominio de unión a antígeno a un dominio de señalización intracelular. El RCAR se expresa en una célula (por ejemplo, una célula efectora
25 inmunitaria) como se describe en el presente documento, por ejemplo, una célula que expresa RCAR (también denominada en el presente documento "célula RCARX"). La célula RCARX es una célula T, y se denomina célula RCART. La célula RCARX es una célula NK, y se denomina célula RCARN. El RCAR puede dotar a la célula que lo expresa de especificidad para una célula diana, típicamente una célula cancerosa, y de generación de señales intracelulares regulables o de proliferación, lo que puede optimizar una propiedad de efector inmunitario de la célula que lo expresa. En las realizaciones, una célula RCAR se basa, al menos en parte, en un dominio de unión a antígeno para proporcionar especificidad a una célula diana que comprende el antígeno unido por el dominio de unión a antígeno.

35 El "anclaje de membrana" o "dominio de anclaje de membrana", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un polipéptido o una fracción, por ejemplo, un grupo miristoilo, suficiente para anclar un dominio extracelular o intracelular a la membrana plasmática.

"Dominio de conmutación", tal como se utiliza este término en el presente documento, por ejemplo, cuando se refiere a un RCAR, se refiere a una entidad, típicamente una entidad basada en un polipéptido, que, en presencia de una molécula de dimerización, se asocia con otro dominio de conmutación. La asociación da lugar a un acoplamiento funcional de una primera entidad vinculada, por ejemplo, fusionada a un primer dominio de conmutación, y una
40 segunda entidad vinculada, por ejemplo, fusionada a un segundo dominio de conmutación. Un primer y un segundo dominio de conmutación se denominan colectivamente conmutador de dimerización. Opcionalmente, el primer y el segundo dominio de conmutación son iguales entre sí, por ejemplo, son polipéptidos que tienen la misma secuencia primaria de aminoácidos, y se denominan colectivamente como conmutador de homodimerización. Opcionalmente, el primer y el segundo dominio de conmutación son diferentes entre sí, por ejemplo, son polipéptidos que tienen
45 diferentes secuencias primarias de aminoácidos, y se denominan colectivamente como un conmutador de heterodimerización. Opcionalmente, el conmutador es intracelular. Opcionalmente, el conmutador es extracelular. Opcionalmente, el dominio de conmutación es una entidad basada en un polipéptido, por ejemplo, FKBP o FRB, y la molécula de dimerización es una molécula pequeña, por ejemplo, un rapálogo. Opcionalmente, el dominio de conmutación es una entidad basada en un polipéptido, por ejemplo, un scFv que se une a un péptido myc, y la molécula de dimerización es un polipéptido, un fragmento del mismo o un multímero de un polipéptido, por ejemplo, un ligando myc o multímeros de un ligando myc que se unen a uno o más scFvs myc. Opcionalmente, el dominio de conmutación es una entidad basada en un polipéptido, por ejemplo, el receptor myc, y la molécula de dimerización es un anticuerpo o fragmentos del mismo, por ejemplo, el anticuerpo myc.

55 La "molécula de dimerización", tal como se utiliza este término en el presente documento, por ejemplo, cuando se refiere a un RCAR, se refiere a una molécula que promueve la asociación de un primer dominio de conmutación con un segundo dominio de conmutación. En la divulgación, la molécula de dimerización no se da de forma natural en el sujeto, o no se da en concentraciones que den lugar a una dimerización significativa. Opcionalmente, la molécula de dimerización es una molécula pequeña, por ejemplo, rapamicina o un rapálogo, por ejemplo, RAD001.

El término "bioequivalente" se refiere a una cantidad de un agente distinto del compuesto de referencia (por ejemplo, RAD001), necesaria para producir un efecto equivalente al producido por la dosis de referencia o la cantidad de referencia del compuesto de referencia (por ejemplo, RAD001). Opcionalmente, el efecto es el nivel de inhibición de mTOR, por ejemplo, medido por la inhibición de la quinasa P70 S6, por ejemplo, evaluado en un ensayo *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, medido por un ensayo descrito en el presente documento, por ejemplo, el ensayo de Boulay, o la medición de los niveles de S6 fosforilada por transferencia western. Opcionalmente, el efecto es la alteración de la relación de células efectoras inmunitarias PD-1 positivas/PD-1 negativas, por ejemplo, células T o células NK, según la medición de la clasificación celular. Opcionalmente, una cantidad o dosis bioequivalente de un inhibidor de mTOR es la cantidad o dosis que logra el mismo nivel de inhibición de la quinasa P70 S6 que la dosis o cantidad de referencia de un compuesto de referencia. Opcionalmente, una cantidad o dosis bioequivalente de un inhibidor de mTOR es la cantidad o dosis que logra el mismo nivel de alteración en la relación de células efectoras inmunitarias PD-1 positivas/PD-1 negativas, por ejemplo, células T o células NK, que la dosis o cantidad de referencia de un compuesto de referencia.

El término "dosis baja, que mejora la inmunidad" cuando se utiliza en conjunción con un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor alostérico de mTOR, por ejemplo, RAD001 o rapamicina, o un inhibidor catalítico de mTOR, se refiere a una dosis de inhibidor de mTOR que inhibe parcialmente, pero no totalmente, la actividad de mTOR, por ejemplo, según la medición de la inhibición de la actividad de la quinasa P70 S6. En el presente documento se discuten procedimientos para evaluar la actividad de mTOR, por ejemplo, mediante la inhibición de la quinasa P70 S6. La dosis es insuficiente para producir una supresión inmunitaria completa, pero es suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria. En una realización, la dosis baja de inhibidor de mTOR, que mejora la inmunidad, produce una disminución del número de células efectoras inmunitarias PD-1 positivas, por ejemplo, células T o células NK, y/o un aumento del número de células efectoras inmunitarias PD-1 negativas, por ejemplo, células T o células NK, o un aumento de la relación de células T PD-1 negativas/ células efectoras inmunitarias PD-1 positivas, por ejemplo, células T o células NK.

En la divulgación, la dosis baja de inhibidor de mTOR, que mejora la inmunidad, da como resultado un aumento en el número de células efectoras inmunes ingenuas, por ejemplo, células T o células NK. Opcionalmente, la dosis baja de inhibidor de mTOR, que mejora la inmunidad, da lugar a uno o más de los siguientes resultados:

un aumento en la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD62L^{high}, CD127^{high}, CD27⁺, y BCL2, por ejemplo, en células T de memoria, por ejemplo, en precursores de células T de memoria;

una disminución de la expresión de KLRG1, por ejemplo, en las células T de memoria, por ejemplo, en los precursores de células T de memoria; y

un aumento del número de precursores de células T de memoria, por ejemplo, células con alguna de las siguientes características o una combinación de ellas: aumento de CD62L^{high}, aumento de CD127^{high}, aumento de CD27⁺, disminución de KLRG1 y aumento de BCL2;

donde se produce cualquiera de los cambios descritos anteriormente, por ejemplo, al menos de forma transitoria, por ejemplo, en comparación con un sujeto no tratado.

"Refractario", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enfermedad, por ejemplo, el cáncer, que no responde a un tratamiento. En la divulgación, un cáncer refractario puede ser resistente a un tratamiento antes o al comienzo del mismo. Opcionalmente, el cáncer refractario puede volverse resistente durante un tratamiento. Un cáncer refractario también se denomina cáncer resistente.

"Recaída" o "recaer", tal y como se utiliza en este documento, se refiere al retorno o reaparición de una enfermedad (por ejemplo, el cáncer) o de los signos y síntomas de una enfermedad como el cáncer después de un período de mejora o de respuesta, por ejemplo, después de un tratamiento previo de una terapia, por ejemplo, la terapia contra el cáncer. El período inicial de respuesta puede implicar que el nivel de células cancerosas caiga por debajo de un determinado umbral, por ejemplo, por debajo del 20 %, 1 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %. La reaparición puede implicar que el nivel de células cancerosas se eleve por encima de un determinado umbral, por ejemplo, por encima del 20 %, 1 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %. Por ejemplo, en el contexto de la B-ALL, la reaparición puede implicar, por ejemplo, una reaparición de blastos en la sangre, en la médula ósea (> 5 %) o en cualquier sitio extramedular, después de una respuesta completa. Una respuesta completa, en este contexto, puede implicar <5 % de blastos de BM. Más generalmente, en una realización, una respuesta (por ejemplo, respuesta completa o respuesta parcial) puede implicar la ausencia de MRD (enfermedad mínima residual) detectable. Opcionalmente, el período inicial de respuesta dura al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días; al menos 1, 2, 3 o 4 semanas; al menos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 12 meses; o al menos 1, 2, 3, 4 o 5 años.

En la divulgación, una terapia que incluye un inhibidor de CD19, por ejemplo, una terapia CD19 CAR, puede recaer o ser refractaria al tratamiento. La recaída o la resistencia puede estar causada por la pérdida de CD19 (por ejemplo, una mutación de pérdida de antígeno) o por otra alteración de CD19 que reduzca el nivel de CD19 (por ejemplo, causada por la selección clonal de clones CD19-negativos). Un cáncer que alberga dicha pérdida o alteración de CD19 se denomina en el presente documento "cáncer CD19-negativo" o "cáncer recidivante CD19-negativo"). Debe entenderse que un cáncer CD19-negativo no necesita tener una pérdida del 100 % de CD19, sino una reducción

suficiente para reducir la eficacia de una terapia de CD19 de manera que el cáncer recaiga o se vuelva refractario. Opcionalmente, un cáncer CD19-negativo resulta de una terapia CD19 CAR.

Intervalos: a lo largo de esta divulgación, varios aspectos de la invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo como el de 1 a 6 tiene subintervalos específicamente revelados como el de 1 a 3, el de 1 a 4, el de 1 a 5, el de 2 a 4, el de 2 a 6, el de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

NKR-CARs

En el presente documento se divulgan composiciones y procedimientos para regular la especificidad y la actividad de las células citotóxicas, por ejemplo, las células T o las células NK, por ejemplo, con un receptor de antígeno quimérico (CAR) de origen no natural que es un NKR-CAR. Un NKR-CAR es un CAR que comparte propiedades funcionales y estructurales con un receptor de la función inmunitaria de las células NK (o NKR). Los NKR y los NKR-CAR se describen en el presente documento, por ejemplo, en la sección siguiente. Como se explica a continuación, una variedad de NKR puede servir de base para un NKR-CAR

RECEPTORES DE LA FUNCIÓN INMUNITARIA DE LAS CÉLULAS NK (NKRS) Y CÉLULAS NK

Como se discute en el presente documento, el receptor de la función inmune de las células NK (o NKR) se refiere a una proteína transmembrana endógena que se produce naturalmente y que se expresa en las células NK, que puede acoplarse con un ligando en una célula presentadora de antígeno y modular una respuesta de la función inmune de las células NK, por ejemplo, puede modular la actividad citolítica o la secreción de citoquinas de la célula NK.

Las células NK son células mononucleares que se desarrollan en la médula ósea a partir de progenitores linfoides, y sus características morfológicas y propiedades biológicas suelen incluir la expresión de los determinantes de agrupación (CD) CD16, CD56 y/o CD57; la ausencia del complejo TCR alfa/beta o gamma/delta en la superficie celular; la capacidad de unirse a células diana que no expresan las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)/antígeno leucocitario humano (HLA), y la capacidad de eliminar células tumorales u otras células enfermas que expresan ligandos para activar los receptores NK. Las células NK se caracterizan por su capacidad de unirse y eliminar varios tipos de líneas celulares tumorales sin necesidad de inmunización o activación previa. Las células NK también pueden liberar proteínas solubles y citoquinas que ejercen un efecto regulador sobre el sistema inmunitario; y pueden someterse a múltiples rondas de división celular y producir células hijas con propiedades biológicas similares a las de la célula madre. Tras su activación por interferones y/o citoquinas, las células NK median en la lisis de células tumorales y de células infectadas con patógenos intracelulares mediante mecanismos que requieren contactos físicos directos entre la célula NK y la célula diana. La lisis de las células diana implica la liberación de gránulos citotóxicos de la célula NK en la superficie de la diana unida, y de proteínas efectoras como la perforina y la granzima B que penetran en la membrana plasmática de la diana e inducen la apoptosis o muerte celular programada. Las células normales y sanas están protegidas de la lisis de las células NK. La actividad de las células NK está regulada por un complejo mecanismo en el que intervienen señales estimulantes e inhibitoras.

En resumen, la actividad lítica de las células NK está regulada por varios receptores de la superficie celular que transducen señales intracelulares positivas o negativas al interactuar con ligandos en la célula diana. El equilibrio entre las señales positivas y negativas transmitidas a través de estos receptores determina si una célula diana es lisada (eliminada) por una célula NK. Las señales de estimulación de las células NK pueden estar mediadas por receptores naturales de citotoxicidad (NCR) como NKp30, NKp44 y NKp46; así como por receptores NKG2C, receptores NKG2D, ciertos receptores activadores de células asesinas similares a inmunoglobulinas (KIR) y otros receptores NK activadores (Lanier, Annual Review of Immunology 2005; 23:225-74). Las señales inhibitoras de las células NK pueden estar mediadas por receptores como Ly49, CD94/NKG2A, así como por ciertos KIR inhibidores, que reconocen las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (Karre et al., Nature 1986; 319:675-8 Ohlen et al, Science 1989; 246:666-8). Estos receptores inhibidores se unen a los determinantes polimórficos de las moléculas MHC de clase I (incluido el HLA de clase I) presentes en otras células e inhiben la lisis mediada por las células NK.

KIR-CARs

Se divulga en el presente documento una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno y un dominio de receptor similar a la inmunoglobulina de células asesinas (KIR-CAR). En una realización, el KIR-CAR de la invención se expresa en la superficie de una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T o una célula NK.

KIR-CAR BASADO EN NK CARs

Los KIR, denominados receptores similares a las inmunoglobulinas de las células asesinas, se han caracterizado en humanos y primates no humanos, y son moléculas transmembrana polimórficas de tipo 1 presentes en ciertos subconjuntos de linfocitos, incluidas las células NK y algunas células T. Los KIRs interactúan con determinantes en los dominios alfa 1 y 2 de las moléculas MHC de clase I y, como se describe en este documento, distintos KIRs son estimulantes o inhibidores de las células NK.

Los NKR-CARs descritos en el presente documento incluyen los KIR-CARs, que comparten propiedades funcionales y estructurales con los KIRs.

Los KIR son una familia de proteínas de superficie celular que se encuentran en las células NK. Regulan la función asesina de estas células al interactuar con las moléculas MHC de clase I, que se expresan en todos los tipos de células. Esta interacción les permite detectar células infectadas por virus o células tumorales. La mayoría de los KIR son inhibidores, lo que significa que su reconocimiento del MHC suprime la actividad citotóxica de la célula NK que los expresa. Sólo un número limitado de KIRs tiene la capacidad de activar células.

La familia de genes KIR tiene al menos 15 loci génicos (KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3 y dos pseudogenes, KIR2DP1 y KIR3DP1) codificados dentro de una región de 100-200 Kb del Complejo Receptor de Leucocitos (LRC) situado en el cromosoma 19 (19q13.4). El LRC constituye una agrupación grande, de 1 Mb, y denso de genes inmunitarios de rápida evolución que contiene genes que codifican otras moléculas de la superficie celular con dominios extracelulares distintivos similares a las Ig. Además, el LRC ampliado contiene genes que codifican las moléculas adaptadoras transmembrana DAP10 y DAP12.

Los genes KIR varían en longitud de 4 a 16 Kb (secuencia genómica completa) y pueden contener de cuatro a nueve exones. Los genes KIR se clasifican en uno de los tres grupos según sus características estructurales: (1) Los genes KIR2D de tipo I, que codifican dos proteínas de dominio extracelular con una conformación D1 y D2; (2) Los genes KIR2D de tipo II, estructuralmente divergentes, que codifican dos proteínas de dominio extracelular con una conformación D0 y D2; y, por último, (3) Los genes KIR3D que codifican proteínas con tres dominios extracelulares similares a las Ig (D0, D1 y D2).

Los genes KIR2D de tipo I, que incluyen el pseudogén KIR2DP1 así como los genes KIR2DL1-3 y KIR2DS1-5, poseen ocho exones así como una secuencia de pseudoexón 3. Este pseudoexón está inactivado en la KIR2D de tipo I. En algunos casos esto se debe a una sustitución de nucleótidos localizada en el sitio de empalme del intrón 2-exón 3 donde su secuencia de nucleótidos exhibe un alto grado de identidad con las secuencias del exón 3 de KIR3D y posee una delección característica de tres pares de bases. En otros casos, un codón de parada prematuro inicia el empalme diferencial del exón 3. Dentro del grupo de genes KIR2D de tipo I, KIR2DL1 y KIR2DL2 comparten una delección común en el exón 7 que los distingue de todos los demás KIR en este exón, lo que da lugar a una secuencia del exón 7 más corta. Del mismo modo, dentro del tipo I KIR2D, KIR2DL1-3 difiere de KIR2DS1-5 sólo en la longitud de su región de codificación de la cola citoplasmática en el exón 9. La estructura del pseudogén KIR2DP1 difiere de la de KIR2DL1-3 en que el primero tiene una secuencia del exón 4 más corta, debido a una delección de un solo par de bases.

Los genes KIR2D de tipo II incluyen KIR2DL4 y KIR2DL5. A diferencia del KIR3D y del KIR2D de tipo I, el KIR2D de tipo II se caracteriza por haber eliminado la región correspondiente al exón 4 en todos los demás KIR. Además, los genes KIR2D de tipo II se diferencian de los de tipo I en que los primeros poseen un exón 3 traducido, mientras que los de tipo I tienen una secuencia de pseudoexón 3 sin traducir en su lugar. Dentro de los genes KIR2D de tipo II, el KIR2DL4 se diferencia además del KIR2DL5 (así como de otros genes KIR) por la longitud de su secuencia del exón 1. En KIR2DL4, se encontró que el exón 1 es seis nucleótidos más largo y posee un codón de iniciación diferente a los presentes en los otros genes KIR. Este codón de iniciación concuerda mejor con la "secuencia de consenso de iniciación de la transcripción de Kozak" que el segundo codón de iniciación potencial en KIR2DL4 que corresponde al codón de iniciación presente en otros genes KIR.

Los genes KIR3D poseen nueve exones e incluyen los genes estructuralmente relacionados KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL2 y KIR3DL3. Las secuencias de nucleótidos de KIR3DL2 son las más largas de todos los genes KIR y abarcan 16.256 pb en las secuencias genómicas completas y 1.368 pb en el ADNc. Dentro del grupo KIR3D, los cuatro genes KIR difieren en la longitud de la región que codifica la cola citoplasmática en el exón 9. La longitud de la cola citoplasmática de las proteínas KIR puede variar desde 14 residuos de aminoácidos (en algunos alelos KIR3DS1) hasta 108 residuos de aminoácidos (en las proteínas KIR2DL4). Además, KIR3DS1 se diferencia de KIR3DL1 o KIR3DL2 en que el primero tiene una secuencia de exón 8 más corta. KIR3DL3 difiere de otras secuencias KIR en que carece completamente del exón 6. La diferencia más extrema en la estructura del gen KIR observada fue la de KIR3DP1. Este fragmento del gen carece completamente de los exones 6 a 9, y ocasionalmente también del exón 2. Las partes restantes del gen que están presentes (exón 1, 3, 4 y 5) comparten un alto nivel de identidad de secuencia con otras secuencias KIR3D, en particular con las secuencias KIR3DL3.

Las proteínas KIR poseen dominios característicos de tipo Ig en sus regiones extracelulares, que en algunas proteínas KIR están implicadas en la unión del ligando HLA de clase I. También poseen regiones transmembrana y citoplasmáticas que son funcionalmente relevantes, ya que definen el tipo de señal que se transduce a la célula NK. Las proteínas KIR pueden tener dos o tres dominios de tipo Ig (de ahí KIR2D o KIR3D), así como colas citoplasmáticas cortas o largas (representadas como KIR2DS o KIR2DL). Las proteínas KIR de dos dominios se subdividen en dos

- grupos en función del origen de los dominios distales de membrana tipo Ig presentes. Las proteínas KIR2D de tipo I (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4 y KIR2DS5) poseen un dominio tipo Ig de membrana-distal similar en origen al dominio tipo Ig D1 de KIR3D, pero carecen de un dominio D0. Este dominio D1 de tipo Ig está codificado principalmente por el cuarto exón de los genes KIR correspondientes. Las proteínas KIR2D de tipo II, KIR2DL4 y KIR2DL5, poseen un dominio tipo Ig de membrana-distal de secuencia similar al dominio D0 presente en las proteínas KIR3D, sin embargo, las KIR2D de tipo II carecen de un dominio D1. Las largas colas citoplasmáticas suelen contener dos motivos inhibidores basados en tirosinas inmunitarias (ITIM) que transducen señales inhibitorias a la célula NK. Las colas citoplásmicas cortas poseen un residuo de aminoácido cargado positivamente en su región transmembrana que les permite asociarse con una molécula de señalización DAP12 capaz de generar una señal de activación. La excepción es KIR2DL4, que contiene sólo un ITIM N-terminal. Además, KIR2DL4 también posee un residuo cargado (arginina) en su dominio transmembrana, una característica que permite a este receptor provocar señales tanto inhibitorias como activadoras. Los KIR controlan la respuesta de las células NK humanas emitiendo señales inhibitorias o activadoras al reconocer los ligandos del MHC de clase I en la superficie de las posibles células diana.
- Las proteínas KIR varían en longitud de 306 a 456 residuos de aminoácidos. Aunque las diferencias en la longitud de la proteína son principalmente consecuencia del número de dominios tipo Ig presentes, la diversidad de la longitud de la región citoplasmática también es un factor que influye. El péptido líder de la mayoría de las proteínas KIR tiene 21 residuos de aminoácidos. Sin embargo, la presencia de un codón de iniciación diferente genera un péptido líder correspondientemente más largo en las proteínas KIR2DL4.
- El dominio D0 tipo Ig presente en las proteínas KIR2D de tipo II y en las proteínas KIR3D tiene una longitud de aproximadamente 96 residuos de aminoácidos. El dominio D1 de las proteínas KIR2D de tipo I y de las KIR3D tiene 102 residuos de aminoácidos, mientras que el dominio D2 de todas las proteínas KIR tiene 98 residuos de aminoácidos. La longitud de la región del tallo varía desde los 24 residuos de aminoácidos presentes en la mayoría de las proteínas KIR, hasta sólo siete residuos de aminoácidos en la proteína divergente KIR3DL3. La región transmembrana tiene 20 residuos de aminoácidos en la mayoría de las proteínas KIR, pero un residuo menos en las proteínas KIR2DL1 y KIR2DL2 como resultado de una delección de tres pares de bases en el exón 7. Por último, la región citoplasmática de las proteínas KIR presenta mayores variaciones de longitud, que van desde 23 residuos de aminoácidos en algunos alelos KIR3DS1 hasta los 96 residuos de aminoácidos presentes en las proteínas KIR3DL2.
- Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos KIR humanos (*Homo sapiens*) están disponibles en la base de datos del NCBI, véase, por ejemplo, el número de acceso NP_037421.2 (GI: 134268644), NP_703144.2 (GI:46488946), NP_001229796.1 (GI:338968852), NP_001229796.1 (GI:338968852), NP_006728.2 (GI:134268642), NP_065396.1 (GI: 11968154), NP_001018091.1 (GI:66267727), NP_001077008.1 (GI:134133244), NP_036444.1 (GI:6912472), NP_055327.1 (GI:7657277), NP_056952.2 (GI:71143139), NP_036446.3 (GI: 116517309), NP_001074239.1 (GI:124107610), NP_002246.5 (GI: 124107606), NP_001074241.1 (GI: 124107604), NP_036445.1 (GI:6912474).
- La nomenclatura de los KIR se basa en el número de dominios extracelulares (KIR2D y KIR3D tienen dos y tres dominios Ig extracelulares, respectivamente) y en si la cola citoplasmática es larga (KIR2DL o KIR3DL) o corta (KIR2DS o KIR3DS). La presencia o ausencia de un determinado KIR es variable de una célula NK a otra dentro de la población NK presente en un mismo individuo. Entre los seres humanos, también existe un nivel relativamente alto de polimorfismo de los genes KIR, estando ciertos genes KIR presentes en algunos individuos, pero no en todos. La expresión de los alelos KIR en las células NK está regulada estocásticamente, lo que significa que, en un individuo dado, un linfocito determinado puede expresar uno, dos o más KIR diferentes, dependiendo del genotipo del individuo. Las células NK de un mismo individuo suelen expresar diferentes combinaciones de KIR, lo que proporciona un repertorio de células NK con diferentes especificidades para las moléculas MHC de clase I.
- Ciertos productos del gen KIR causan la estimulación de la actividad de los linfocitos cuando se unen a un ligando apropiado. Todos los KIR activadores tienen una cola citoplasmática corta con un residuo transmembrana cargado que se asocia con una molécula adaptadora que tiene un motivo de activación basado en tirosina inmuno-receptora (ITAM) que transduce señales estimulantes a la célula NK. Por el contrario, los KIR inhibidores tienen una larga cola citoplasmática que contiene un motivo inhibidor basado en tirosinas inmuno-receptoras (ITIM), que transduce señales inhibitorias a la célula NK tras el enganche de sus ligandos MHC de clase I. Los KIRs inhibidores conocidos incluyen miembros de las subfamilias KIR2DL y KIR3DL. Los KIRs inhibidores con dos dominios Ig (KIR2DL) reconocen los alotipos HLA-C: KIR2DL2 (anteriormente designado como p58.2) y el producto genético alélico KIR2DL3, estrechamente relacionado, reconocen ambos alotipos HLA-C del "grupo 1" (incluyendo HLA-Cw1, -3, -7 y -8), mientras que KIR2DL1 (p58.1) reconoce alotipos HLA-C del "grupo 2" (como HLA-Cw2, -4, -5 y -6). El reconocimiento por parte de KIR2DL1 viene dictado por la presencia de un residuo Lys en la posición 80 de los alelos HLA-C. El reconocimiento de KIR2DL2 y KIR2DL3 está dictado por la presencia de un residuo de Asn en la posición 80 del HLA-C. Es importante destacar que la gran mayoría de los alelos del HLA-C tienen un residuo de Asn o de Lys en la posición 80. Por lo tanto, los KIR2DL1, -2 y -3 reconocen colectivamente todos los alotipos HLA-C que se encuentran en los seres humanos. Un KIR con tres dominios Ig, KIR3DL1 (p70), reconoce un epítipo compartido por los alelos HLA-Bw4. Por último, KIR3DL2 (p140), un homodímero de moléculas con tres dominios Ig, reconoce HLA-A3 y -A11.

Sin embargo, la divulgación no debe limitarse a los KIRs inhibidores que comprenden una cola citoplasmática que contiene ITIM. Más bien, cualquier proteína inhibidora que tenga un dominio citoplásmico que se asocie con una señal inhibidora puede utilizarse en la construcción de los CAR de la divulgación. Ejemplos no limitantes de una proteína inhibidora incluyen pero no se limitan a CTLA-4, PD-1, y similares. Se sabe que estas proteínas inhiben la activación de las células T.

En consecuencia, la divulgación proporciona un KIR-CAR que comprende un dominio extracelular que comprende un elemento de unión específico de la diana, también denominado dominio de unión a antígeno, fusionado a un KIR o fragmento del mismo. Opcionalmente, el KIR es un KIR activador que comprende una cola citoplasmática corta que se asocia con una molécula adaptadora que tiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAMs) que transduce señales estimulantes a la célula NK (denominada en este documento actKIR-CAR). Opcionalmente, el KIR es un KIR inhibidor que comprende una larga cola citoplasmática que contiene un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM), que transduce señales inhibitorias (referido en otro lugar del presente documento como inhKIR-CAR). En algunos casos, es deseable eliminar la región bisagra para los KIR activadores cuando se construye un actKIR-CAR. Esto se debe a que la invención se basa en parte en el descubrimiento de que un KIR CAR activador en el que se eliminó la bisagra de KIR2DS2 para generar el KIR2S CAR, este KIR2S CAR exhibió una actividad citolítica mejorada en comparación con un actKIR-CAR que comprende un KIR2DS2 de tipo silvestre de longitud completa.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas de la invención pueden obtenerse utilizando procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, como, por ejemplo, mediante el cribado de bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que lo incluye, o aislando directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el gen de interés puede ser producido sintéticamente, en lugar de ser clonado.

La presente divulgación incluye constructos de vectores retrovirales y lentivirales que expresan un KIR-CAR que puede transducirse directamente en una célula. La presente divulgación también incluye un constructo de ARN que puede transfectarse directamente en una célula. Un procedimiento para generar ARNm para su uso en la transfección implica la transcripción *in vitro* (IVT) de una plantilla con cebadores especialmente diseñados, seguida de la adición de poliA, para producir un constructo que contenga la secuencia no traducida ("UTR") 3' y 5', una tapa 5' y/o un sitio de entrada del ribosoma interno (IRES), el gen que se va a expresar y una cola de poliA, normalmente de 50-2000 bases de longitud. El ARN así producido puede transfectar eficazmente diferentes tipos de células. Opcionalmente, la plantilla incluye secuencias para el KIR-CAR.

Opcionalmente, un KIR-CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un dominio transmembrana KIR. Opcionalmente, un KIR-CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un dominio intracelular KIR, por ejemplo, un dominio intracelular inhKIR.

El dominio D de KIR, tal y como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un dominio D0, D1 o D2 de un KIR

El dominio D de KIR, tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un dominio polipeptídico que tiene propiedades estructurales y funcionales de un dominio D de un KIR.

El dominio D0 de KIR, tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un dominio D0 de un KIR. En una realización, el dominio KIR D0 de un KIR-CAR tiene al menos un 70, 80, 85, 90, 95 o 99 % de homología con una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D0 natural o un dominio KIR D0 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio KIR D0 de un KIR-CAR no difiere en más de 15, 10, 5, 2 o 1 % de sus residuos de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D0 natural o un dominio KIR D0 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio KIR D0 de un KIR-CAR no difiere en más de 5, 4, 3, 2 o 1 residuo de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D0 de origen natural o un dominio KIR D0 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio KIR D0 de un KIR-CAR no difiere de, o comparte el 100 % de homología con, una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D0 de origen natural o un dominio KIR D0 descrito en el presente documento.

El dominio D1 de KIR, tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un dominio polipeptídico que tiene propiedades estructurales y funcionales de un dominio D1 de un KIR. Opcionalmente, el dominio KIR D1 de un KIR-CAR tiene al menos un 70, 80, 85, 90, 95 o 99 % de homología con una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D1 natural o un dominio KIR D1 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio KIR D1 de un KIR-CAR no difiere en más de 15, 10, 5, 2 o 1 % de sus residuos de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D1 natural o un dominio KIR D1 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio KIR D1 de un KIR-CAR no difiere en más de 5, 4, 3, 2 o 1 residuo de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D0 natural o un dominio KIR D1 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio KIR D1 de un KIR-CAR no difiere de, o comparte el 100 % de homología con, una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D1 de origen natural o un dominio KIR D1 descrito en el presente documento.

El dominio D2 de KIR, tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un dominio polipeptídico que tiene propiedades estructurales y funcionales de un dominio D2 de un KIR. Opcionalmente, el dominio KIR D2 de

un KIR-CAR tiene al menos un 70, 80, 85, 90, 95 o 99 % de homología con una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D2 natural o un dominio KIR D2 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio KIR D2 de un KIR-CAR no difiere en más de 15, 10, 5, 2 o 1 % de sus residuos de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D2 natural o un dominio KIR D2 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio KIR D2 de un KIR-CAR no difiere en más de 5, 4, 3, 2 o 1 residuo de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D2 de origen natural o un dominio KIR D2 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio KIR D2 de un KIR-CAR no difiere de, o comparte el 100 % de homología con, una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio KIR D2 de origen natural o un dominio KIR D2 descrito en el presente documento.

El dominio de bisagra o de tallo de KIR, tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un dominio polipeptídico que tiene propiedades estructurales y funcionales de un dominio de bisagra o de tallo de un KIR. Opcionalmente, el dominio de bisagra o tallo de KIR de un KIR-CAR tiene al menos un 70, 80, 85, 90, 95 o 99 % de homología con una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio de bisagra o tallo de KIR de origen natural o un dominio de bisagra o tallo de KIR descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio de bisagra o tallo de KIR de un KIR-CAR no difiere en más de 15, 10, 5, 2 o 1 % de sus residuos de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio de bisagra o tallo de KIR de origen natural o un dominio de bisagra o tallo de KIR descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio de bisagra o tallo de KIR de un KIR-CAR no difiere en más de 5, 4, 3, 2 o 1 residuo de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio de bisagra o tallo de KIR de origen natural o un dominio de bisagra o tallo de KIR descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio de bisagra o tallo de KIR de un KIR-CAR no difiere de, o comparte el 100 % de homología con, una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio de bisagra o tallo de KIR de origen natural o un dominio de bisagra o tallo de KIR descrito en el presente documento.

El dominio transmembrana de KIR, tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un dominio polipeptídico que tiene propiedades estructurales y funcionales de un dominio transmembrana de un KIR. Opcionalmente, el dominio transmembrana KIR de un KIR-CAR tiene al menos un 70, 80, 85, 90, 95 o 99 % de homología con una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio transmembrana KIR de origen natural o un dominio transmembrana KIR descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio transmembrana KIR de un KIR-CAR no difiere en más de 15, 10, 5, 2 o 1 % de sus residuos de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio transmembrana KIR natural o un dominio transmembrana KIR descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio transmembrana KIR de un KIR-CAR no difiere en más de 5, 4, 3, 2 o 1 residuo de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio transmembrana KIR de origen natural o un dominio transmembrana KIR descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio transmembrana KIR de un KIR-CAR no difiere de, o comparte el 100 % de homología con, una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio transmembrana KIR de origen natural o un dominio transmembrana KIR descrito en el presente documento.

El dominio intracelular KIR, tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un dominio polipeptídico que tiene propiedades estructurales y funcionales de un dominio intracelular de un KIR. Los dominios intracelulares KIR comprenden dominios intracelulares KIR inhibidores (denominados en el presente documento dominios intracelulares inhKIR) y dominios intracelulares KIR activadores (denominados en el presente documento dominios intracelulares actKIR). Opcionalmente, el dominio intracelular inhKIR comprende una secuencia ITIM. Opcionalmente, el dominio intracelular KIR de un KIR-CAR tiene al menos un 70, 80, 85, 90, 95 o 99 % de homología con una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio intracelular KIR de origen natural o un dominio intracelular KIR descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio intracelular KIR de un KIR-CAR no difiere en más de 15, 10, 5, 2 o 1 % de sus residuos de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio intracelular KIR de origen natural o un dominio intracelular KIR descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio intracelular KIR de un KIR-CAR no difiere en más de 5, 4, 3, 2 o 1 residuo de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio intracelular KIR natural o un dominio intracelular KIR descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio intracelular KIR de un KIR-CAR no difiere de, o comparte el 100 % de homología con, una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio intracelular KIR de origen natural o un dominio intracelular KIR descrito en el presente documento.

NCRs

Los NKR-CARs descritos en el presente documento incluyen los NCR-CARs, que comparten propiedades funcionales y estructurales con los NCRs.

Las células asesinas naturales (NK) son células linfoides citotóxicas especializadas en la destrucción de tumores y células infectadas por virus. A diferencia de los linfocitos T citotóxicos, las células NK no expresan receptores específicos de antígenos. El reconocimiento de las células transformadas se produce a través de la asociación de una multitud de receptores de superficie celular con marcadores de superficie de la célula diana. Los receptores de superficie de las células NK pueden distinguirse en función de si activan o inhiben la citotoxicidad mediada por las células NK. Numerosas interacciones entre diferentes receptores parecen conducir a la formación de sinapsis entre las células NK y las células diana. La integración de las señales activadoras e inhibidoras en la sinapsis dicta si las células NK ejercen o no su función citolítica sobre la célula diana. Entre los receptores activadores, la familia de moléculas tipo Ig se denomina receptores naturales de citotoxicidad (NCR). Estos receptores naturales de citotoxicidad incluyen las moléculas Nkp30, Nkp44 y Nkp46. Los NCR son receptores activadores clave para las células NK en el

reconocimiento de las células tumorales. Los tres NCRs están implicados en la eliminación tanto de las células tumorales como de las infectadas por el virus. En este último, la actividad antiviral se inicia por la interacción de la NKp44 con la hemaglutinina del virus de la gripe o del virus de Sendai. La NKp46 se dirige a las células infectadas por el virus uniéndose a la hemaglutinina del virus de la gripe o a la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de Sendai. Por el contrario, se ha demostrado que la citotoxicidad mediada por las células NK es inhibida por la unión de NKp30 a la proteína citomegaloviral humana pp65 (véase, por ejemplo Arnon, et. al., Nat. Immunol. (2005) 6:515-523).

Las secuencias de aminoácidos de un polipéptido NCR humano (*Homo sapiens*) están disponibles en la base de datos del NCBI, véase por ejemplo número de acceso NP_004819.2 (GI:153945782), 014931.1 (GI:47605770), O95944.2 (GI:251757303), 076036.1 (GI:47605775), NP_001138939.1 (GI:224586865), y/o NP_001138938.1 (GI:224586860).

10 Receptores SLAM

Los NKR-CARs descritos en el presente documento incluyen los SLAMF -CARs, que comparten propiedades funcionales y estructurales con los SLAMFs.

La familia de receptores de células inmunitarias de la molécula de activación linfocítica de señalización (SLAM) está estrechamente relacionada con la familia CD2 de la superfamilia de moléculas de inmunoglobulina (Ig). La familia SLAM (SLAMF) incluye actualmente nueve miembros denominados SLAM, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME y CD2F-10. En general, las moléculas SLAM poseen de dos a cuatro dominios Ig extracelulares, un segmento transmembrana y una región intracelular rica en tirosina. Las moléculas se expresan de forma diferencial en diversos tipos de células inmunitarias. Varios son autoligandos y el SLAM ha sido identificado como el receptor del virus del sarampión humano. Se sabe que varias pequeñas proteínas adaptadoras que contienen SH2 se asocian con los dominios intracelulares de los miembros de la familia SLAM y modulan la señalización del receptor, incluyendo SH2D1A (también conocida como proteína asociada a SLAM [SAP]) y SH2D1B (también conocida como EAT2). Por ejemplo, en las células T y NK, los receptores de la familia SLAM activados se fosforilan en la tirosina y reclutan el adaptador SAP y, posteriormente, la quinasa Src Fyn. La consiguiente cascada de transducción de señales influye en el resultado de las interacciones entre las células T y las células presentadoras de antígenos y entre las células NK y las células diana.

Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos receptores SLAM humanos (*Homo sapiens*) están disponibles en la base de datos del NCBI, véase, por ejemplo, el número de acceso NP_057466.1 (GI: 7706529), NP_067004.3 (GI: 19923572), NP_003028.1 (GI:4506969), NP_001171808.1 (GI: 296434285), NP_001171643.1 (GI:296040491), NP_001769.2 (GI:21361571), NP_254273.2 (GI: 226342990), NP_064510.1 (GI: 9910342) y/o NP_002339.2 (GI: 55925578)

30 Receptores de unión a Fc

Los NKR-CARs descritos en el presente documento incluyen CARs basados en los receptores Fc, FcR-CARs, por ejemplo, CD16 -CARs, y CD64-CARs, que comparten propiedades funcionales y estructurales con CD16 y CD64.

Al activarse, las células NK producen citoquinas y quimioquinas en abundancia y al mismo tiempo exhiben una potente actividad citolítica. La activación de las células NK puede producirse a través de la unión directa de los receptores de las células NK a los ligandos de la célula diana, como se observa en la eliminación directa de células tumorales, o a través de la reticulación del receptor Fc (CD 16; FcγRIII) mediante la unión a la porción Fc de los anticuerpos unidos a una célula portadora de antígeno. Este acoplamiento de CD16 (entrecruzamiento de CD16) inicia las respuestas de las células NK a través de señales intracelulares que se generan a través de una, o ambas, de las cadenas adaptadoras asociadas a CD16, FcRγ o CD3 ζ. La activación de CD16 conduce a la fosforilación de la cadena γ o ζ, que a su vez recluta a las tirosina quinasas, syk y ZAP-70, iniciando una cascada de transducción de señales que conduce a funciones efectoras rápidas y potentes. La función efectora más conocida es la liberación de gránulos citoplasmáticos que transportan proteínas tóxicas para matar a las células diana cercanas mediante el proceso de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. El entrecruzamiento de CD16 también da lugar a la producción de citoquinas y quimioquinas que, a su vez, activan y orquestan una serie de respuestas inmunitarias.

Sin embargo, a diferencia de los linfocitos T y B, se cree que las células NK sólo tienen una capacidad limitada de reconocimiento de objetivos mediante receptores de activación codificados en la línea germinal (Bottino et al., Curr Top Microbiol Immunol. 298:175-182 (2006) Stewart et al., Curr Top Microbiol Immunol. 298:1-21 (2006)). Las células NK expresan el receptor Fc activador CD 16, que reconoce las células diana recubiertas de IgG, ampliando así el reconocimiento de la diana (Ravetch & Bolland, Annu Rev Immunol. 19:275-290 (2001) Lanier Nat. Immunol. 9(5):495-502 (2008) Bryceson & Long, Curr Opin Immunol. 20(3):344-352 (2008)). La expresión y la actividad de transducción de señales de varios receptores de activación de células NK requieren adaptadores asociados físicamente, que transducen señales a través de motivos de activación basados en tirosinas inmunorreceptoras (ITAM). Entre estos adaptadores, las cadenas FcRγ y CD3 ζ pueden asociarse con CD16 y con los receptores naturales de citotoxicidad (NCR) como homodímeros o heterodímeros enlazados por disulfuro, y se ha pensado que estas cadenas son expresadas por todas las células NK maduras.

La secuencia de aminoácidos de CD16 (*Homo sapiens*) está disponible en la base de datos del NCBI, véase, por ejemplo, el número de acceso NP_000560.5 (GI: 50726979), NP_001231682.1 (GI: 348041254)

Ly49 y receptores relacionados similares a las lectinas de las células asesinas

Los NKR-CARs descritos en el presente documento incluyen los Ly49-CARs, que comparten propiedades funcionales y estructurales con Ly49.

5 Los receptores Ly49 derivan de al menos 23 genes identificados (Ly49A-W) en ratones. Estos receptores comparten muchas de las funciones en las células NK y las células T de los ratones que desempeñan los KIR en los seres humanos, a pesar de su diferente estructura (proteínas integrales de membrana de tipo II de la superfamilia de lectinas de tipo C), y también contienen un grado considerable de variación genética como los KIR humanos. La notable similitud funcional entre los receptores Ly49 y KIR sugiere que estos grupos de receptores han evolucionado de forma independiente pero convergente para realizar las mismas funciones fisiológicas en las células NK y en las células T.

10 Al igual que los KIRs en los humanos, los diferentes receptores Ly49 reconocen diferentes alelos del MHC clase I y se expresan diferencialmente en subconjuntos de células NK. Los receptores originales prototípicos de Ly49, Ly49A y Ly49C, poseen un dominio citoplasmático con dos motivos inhibitorios basados en la inmunotribosina (ITIM) similares a los KIRs inhibitorios como KIR2DL3. Se ha identificado que estos dominios reclutan la fosfatasa SHP-1 y, al igual que los KIR inhibitorios, sirven para limitar la activación de las células NK y las células T. Además de las moléculas inhibitorias Ly49, varios miembros de la familia como Ly49D y Ly49H han perdido los dominios que contienen ITIM, y en su lugar han adquirido la capacidad de interactuar con la molécula adaptadora de señalización, DAP12 similar a los KIRs activadores como KIR2DS2 en humanos.

15 Las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia Ly49 están disponibles en la base de datos del NCBI, véase, por ejemplo, los números de acceso AAF82184.1 (GI: 9230810), AAF99547.1 (GI: 9801837), NP_034778.2 (GI: 133922593), NP_034779.1 (GI: 6754462), NP_001095090.1 (GI: 197333718), NP_034776.1 (GI: 21327665), AAK11559.1 (GI: 13021834) y/o NP_038822.3 (GI: 9256549).

Dominios de señalización intracelular o moléculas adaptadoras, por ejemplo, DAP12

Algunos NKR-CARs interactúan con otras moléculas, por ejemplo, moléculas que comprenden un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un ITAM. En una realización un dominio de señalización intracelular es DAP12.

25 El DAP12 se llama así por sus características estructurales y su presunta función. Algunos receptores de la superficie celular carecen de funcionalidad intrínseca, por lo que hipotéticamente pueden interactuar con otra proteína asociada, que se sugiere que sea una proteína de 12 kD. El mecanismo de la señalización puede implicar una señal ITAM.

30 El DAP12 se identificó a partir de bases de datos de secuencias basándose en una hipotética relación con el CD3 (véase Olcese, et al. (1997) J. Immunol. 158:5083-5086), la presencia de una secuencia ITAM (véase Thomas (1995) J. Exp. Med. 181:1953-1956), ciertas predicciones de tamaño (véase Olcese; y Takase, et al. (1997) J. Immunol. 159:741-747) otras características. En particular, se planteó la hipótesis de que el dominio transmembrana contiene un residuo cargado, lo que permitiría establecer un puente salino con los correspondientes segmentos transmembrana de sus presuntos socios receptores, la proteína KIR CD94, y posiblemente otras proteínas similares. Véase Daeron, et al. (1995) Inmunidad 3:635-646.

35 De hecho, muchas de las moléculas conocidas de los receptores KIR, MIR, ILT y CD94/NKG2 pueden funcionar realmente con una proteína accesoria que forma parte del complejo funcional del receptor. Véase Olcese, et al. (1997) J. Immunol. 158:5083-5086 y Takase, et al. (1997) J. Immunol. 159:741-747.

40 Un dominio DAP 12, tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un dominio polipeptídico que tiene propiedades estructurales y funcionales de un dominio citoplasmático de un DAP 12, y típicamente incluirá un dominio ITAM. En una realización, un dominio DAP 12 de un KIR-CAR tiene al menos un 70, 80, 85, 90, 95 o 99 % de homología con una secuencia de referencia, por ejemplo, un DAP 12 natural o un DAP 12 descrito en el presente documento. En las realizaciones, el dominio DAP 12 de un KIR-CAR no difiere en más de 15, 10, 5, 2 o 1 % de sus residuos de una secuencia de referencia, por ejemplo, un DAP12 de origen natural o un DAP12 descrito en el presente documento. En las realizaciones, el dominio DAP 12 de un KIR-CAR no difiere en más de 5, 4, 3, 2 o 1 residuo de una secuencia de referencia, por ejemplo, un DAP12 de origen natural o un DAP12 descrito en el presente documento. En las realizaciones, el dominio DAP 12 de un KIR-CAR no difiere de una secuencia de referencia, o comparte el 100 % de homología con ella, por ejemplo, un DAP12 natural o un DAP12 descrito en el presente documento.

45 El DAP10 fue identificado en parte por su homología con el DAP12, y otras características. En particular, a diferencia del DAP12, que presenta un motivo de activación ITAM, el DAP10 presenta un motivo de inhibición ITIM. El MDL-1 fue identificado por su asociación funcional con el DAP12.

50 La interacción funcional entre, por ejemplo, DAP12 o DAP10, y su receptor accesorio puede permitir el uso de la combinación estructural en receptores que normalmente no se encuentran en forma de receptor truncado. Así, el mecanismo de señalización a través de proteínas accesorias como el DAP12 y el DAP10 permite una interesante ingeniería de otros complejos de receptores tipo KIR, por ejemplo, con los receptores tipo KIR, MIR, ILT y CD94 NKG2. Se pueden construir formas truncadas de receptores intactos que interactúen con un DAP12 o DAP10 para formar un complejo de señalización funcional.

La secuencia de nucleótidos de primates de DAP12 corresponde a los nucleótidos 1 a 339 de la SEQ ID NO: 332; la secuencia de aminoácidos corresponde a los aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 333. La secuencia de señalización parece ir desde met(-26) hasta gln(-1) o ala1; la proteína madura debería ir desde aproximadamente ala1 (o gln2), el dominio extracelular desde aproximadamente ala1 hasta pro14; el dominio extracelular contiene dos cisteínas en 7 y 9, que probablemente permiten enlaces disulfuro con proteínas accesorias adicionales homotípicas o heterotípicas; la región transmembrana va desde aproximadamente gly15 o val16 hasta aproximadamente gly39; y un motivo ITAM desde tyr65 hasta leu79 (YxxL-6/8x-YxxL) (SEQ ID NO: 341). La EST LVA03A fue identificada y utilizada para extraer otras secuencias superpuestas. Véase también Genbank Human ESTs que son parte de DAP12 humano; algunos, pero no todos, inclusive Genbank Accession # AA481924; H39980; W60940; N41026; R49793; W60864; W92376; H12338; T52100; AA480109; H12392; W74783; and T55959.

INHIBIDORES NKR-CARS

La presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para limitar el agotamiento de células no cancerosas por un tipo de terapia de células T CAR. Como se divulga en el presente documento, un tipo de terapia con células T CAR comprende el uso de receptores NK, incluyendo, pero sin limitarse a ello, los receptores activadores e inhibidores de las células NK conocidos como receptor similar a la inmunoglobulina de las células asesinas (KIR). En consecuencia, la divulgación proporciona composiciones y procedimientos de uso de un NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR, incluyendo, pero sin limitarse a ello, un NKR-CAR activador (actNKR-CAR), por ejemplo, un KIR-CAR activador (actKIR-CAR) y un NKR-CAR inhibidor (inhNKR-CAR), por ejemplo, un KIR-CAR inhibidor (inhKIR-CAR).

Opcionalmente, el KIR de un inhKIR-CARs es un KIR inhibidor que comprende una cola citoplasmática larga que contiene un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM), que transduce señales inhibitorias (referido en otro lugar en el presente documento como inhKIR-CAR).

Opcionalmente, un inhKIR-CAR comprende un dominio citoplasmático de una molécula inhibidora distinta de KIR. Estas moléculas inhibidoras pueden disminuir la capacidad de una célula para montar una respuesta efectoras inmune. Los dominios citoplasmáticos de las moléculas inhibidoras pueden acoplarse, por ejemplo, por fusión, a los dominios transmembrana de KIR. En la Tabla 1 se muestran ejemplos de moléculas inhibidoras:

Tabla 1: Moléculas inhibidoras

PD1	TIGIT	KIR
PD-L1	LAIR1	A2aR
PD-L2	CD160	MHC clase I
CTLA4	2B4	MHC clase II
TIM3	CD80	GAL9
CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5)	CD86	Adenosina
LAG3	B7-H3 (CD276)	TGFR (por ejemplo, TGFRbeta)
VISTA	B7-H4 (VTCN1)	
BTLA	HVEM (TNFRSF14 o CD270)	

Opcionalmente, un inhKIR-CAR comprende un dominio citoplasmático de PD1. Un dominio citoplásmico de PD1, tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un dominio polipeptídico que tiene propiedades estructurales y funcionales de un dominio citoplásmico de una PD1. Opcionalmente, el dominio citoplásmico de PD1 de un KIR-CAR tiene al menos un 70, 80, 85, 90, 95 o 99 % de homología con una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio citoplásmico de PD1 natural o un dominio citoplásmico de PD1 descrito en el presente documento (SEQ ID NO: 338). Opcionalmente, el dominio citoplásmico de PD1 de un KIR-CAR no difiere en más de 15, 10, 5, 2 o 1 % de sus residuos de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio citoplásmico de PD1 de origen natural o un dominio citoplásmico de PD1 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio citoplásmico de PD1 de un KIR-CAR difiere en no más de 5, 4, 3, 2 o 1 residuo de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio citoplásmico de PD1 de origen natural o un dominio citoplásmico de PD1 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio citoplásmico de PD1 de un KIR-CAR no difiere de, o comparte el 100 % de homología con, una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio citoplásmico de PD1 de origen natural o un dominio citoplásmico de PD1 descrito en el presente documento.

Opcionalmente, un inhKIR-CAR comprende un dominio citoplasmático de CTLA-4. Un dominio citoplásmico de CTLA-4, tal como se utiliza ese término en el presente documento, se refiere a un dominio polipeptídico que tiene propiedades estructurales y funcionales de un dominio citoplásmico de un CTLA-4. Opcionalmente, el dominio citoplásmico CTLA-4 de un KIR-CAR tiene al menos un 70, 80, 85, 90, 95 o 99 % de homología con una secuencia de referencia, por

ejemplo, un dominio citoplásmico CTLA-4 de origen natural o un dominio citoplásmico CTLA-4 descrito en el presente documento (SEQ ID NO: 339). Opcionalmente, el dominio citoplásmico CTLA-4 de un KIR-CAR no difiere en más de 15, 10, 5, 2 o 1 % de sus residuos de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio citoplásmico CTLA-4 de origen natural o un dominio citoplásmico CTLA-4 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio citoplásmico CTLA-4 de un KIR-CAR difiere en no más de 5, 4, 3, 2 o 1 residuo de una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio citoplásmico CTLA-4 natural o un dominio citoplásmico CTLA-4 descrito en el presente documento. Opcionalmente, el dominio citoplásmico CTLA-4 de un KIR-CAR no difiere de, o comparte el 100 % de homología con, una secuencia de referencia, por ejemplo, un dominio citoplásmico CTLA-4 de origen natural o un dominio citoplásmico CTLA-4 descrito en el presente documento.

5 Opcionalmente, un inhNKR-CAR, por ejemplo, un inhKIR-CAR, al entrar en contacto con un antígeno en una célula que no es el objetivo o una célula secundaria, inactiva la célula citotóxica que comprende el inhNKR-CAR. Aunque gran parte de la descripción que sigue se refiere a los inhKIR-CAR, la divulgación incluye la aplicación análoga de otros inhNKR-CAR.

10 Opcionalmente, las células T que expresan el actKIR-CAR exhiben una propiedad antitumoral cuando se unen a su objetivo, mientras que las células T que expresan un inhKIR-CAR resultan en la inhibición de la actividad celular cuando el inhKIR-CAR se une a su objetivo.

Independientemente del tipo de KIR-CAR, los KIR-CAR están diseñados para comprender un dominio extracelular que tiene un dominio de unión a antígeno fusionado a un dominio citoplásmico. En una realización, los KIR-CARs, cuando se expresan en una célula T, son capaces de redirigir el reconocimiento del antígeno basándose en la especificidad del mismo. Un antígeno ejemplar es el CD19 porque este antígeno se expresa en el linfoma de células B. Sin embargo, el CD19 también se expresa en las células B normales y, por lo tanto, los CAR que comprenden un dominio anti-CD19 pueden provocar el agotamiento de las células B normales. El agotamiento de las células B normales puede hacer que el sujeto tratado sea susceptible a la infección, ya que las células B normalmente ayudan a las células T en el control de la infección. La presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para limitar el agotamiento del tejido normal durante la terapia de células T KIR-CAR. La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer y otros trastornos utilizando la terapia de células T KIR-CAR al tiempo que se limita el agotamiento de las células secundarias sanas.

La divulgación comprende controlar o regular la actividad de las células T KIR-CAR. La divulgación comprende composiciones y procedimientos relacionados con la modificación genética de células T para que expresen una pluralidad de tipos de KIR-CAR, donde la activación de células T KIR-CAR depende de la unión de una pluralidad de tipos de KIR-CAR a su receptor objetivo. La dependencia de la unión de una pluralidad de tipos de KIR-CAR mejora la especificidad de la actividad lítica de la célula T KIR-CAR, reduciendo así el potencial de agotamiento del tejido sano normal.

La divulgación comprende composiciones y procedimientos relacionados con la modificación genética de células T con un KIR-CAR inhibidor. Opcionalmente, el KIR-CAR inhibidor comprende un dominio extracelular de unión a antígeno que reconoce un antígeno asociado a una célula normal, no cancerosa, y un dominio citoplásmico inhibidor.

Opcionalmente, la divulgación proporciona un KIR-CAR dual en el que una célula T se modifica genéticamente para expresar un inhKIR-CAR y un actKIR-CAR. Opcionalmente, la unión del inhKIR-CAR a una célula normal, no cancerosa, resulta en la inhibición de la célula T KIR-CAR dual. Por ejemplo, la unión del inhKIR-CAR a una célula normal, no cancerosa, provoca la muerte de la célula T KIR-CAR dual. La unión del inhKIR-CAR a una célula normal, no cancerosa, tiene como resultado la inhibición de la transducción de señales del actKIR-CAR. La unión del inhKIR-CAR a una célula normal, no cancerosa, da lugar a la inducción de una señal de transducción de señales que impide que la célula T actKIR-CAR muestre su actividad antitumoral. En consecuencia, el KIR-CAR dual que comprende al menos un inhKIR-CAR y al menos un actKIR-CAR de la divulgación proporciona un mecanismo para regular la actividad de la célula T KIR-CAR dual.

La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer y otros trastornos utilizando terapias de células T KIR-CAR al tiempo que se minimiza el agotamiento del tejido sano normal. El cáncer puede ser una neoplasia hematológica, un tumor sólido, un tumor primario o una metástasis. Otras enfermedades que se pueden tratar con las composiciones y procedimientos de la divulgación incluyen infecciones virales, bacterianas y parasitarias, así como enfermedades autoinmunes.

DOMINIO DE BISAGRA EXTRACELULAR

El dominio extracelular de bisagra, tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a una secuencia polipeptídica de un NKR-CAR dispuesta entre el dominio transmembrana y el dominio de unión a antígeno. En una realización, el dominio de bisagra extracelular permite una distancia suficiente entre la superficie exterior de la célula y el dominio de unión a antígeno, así como flexibilidad para minimizar la obstaculización estérica entre la célula y el dominio de unión a antígeno. Como se describe en el presente documento, el dominio de bisagra extracelular es lo suficientemente corto o flexible como para no interferir con el acoplamiento de la célula que incluye el NKR-CAR con una célula portadora de antígeno, por ejemplo, una célula diana. Como se describe en el presente documento, el dominio de bisagra extracelular tiene una longitud de 2 a 20, 5 a 15, 7 a 12, o 8 a 10 aminoácidos. Como se describe

en el presente documento, el dominio de bisagra incluye al menos 50, 20 o 10 residuos. Como se describe en el presente documento, la bisagra tiene una longitud de 10 a 300, 10 a 250 o 10 a 200 residuos. Como se describe en el presente documento, la distancia desde la que se extiende la bisagra desde la célula es lo suficientemente corta como para que la bisagra no obstaculice el enganche con la superficie de una célula diana. Como se describe en el presente documento, la bisagra se extiende a menos de 20, 15 o 10 nanómetros de la superficie de la célula citotóxica. Así pues, la idoneidad de una bisagra puede verse influida tanto por la longitud lineal como por el número de residuos de aminoácidos y la flexibilidad de la bisagra. Una bisagra de IgG4 puede tener una longitud de hasta 200 aminoácidos, pero la distancia que se extiende desde la superficie de la célula citotóxica es menor debido al plegado del dominio Ig. Una bisagra de CD8alfa, que es ~43 aminoácidos es bastante lineal con una longitud de ~ 8 nm. Por el contrario, la bisagra C2 y C3 de la IgG4 es ~200 aminoácidos de longitud, pero tiene una distancia de la superficie de la célula citotóxica comparable a la de la bisagra CD8 alfa. Sin querer ceñirse a la teoría, la similitud en la extensión está influenciada por la flexibilidad.

En algunos casos, el dominio de bisagra extracelular es, por ejemplo, una bisagra de una proteína humana, un fragmento de la misma o un enlazador oligo o polipeptídico corto.

Como se describe en este documento, la bisagra es una secuencia artificial. Opcionalmente, la bisagra es un enlazador oligopéptido corto que comprende un doblete de glicina-serina.

Como se describe en el presente documento, la bisagra es una secuencia natural. Como se describe en el presente documento, la bisagra puede ser una bisagra de Ig (inmunoglobulina) humana, o un fragmento de la misma. Opcionalmente, por ejemplo, la bisagra comprende (por ejemplo, consiste en) la secuencia de aminoácidos de la bisagra de IgG4 (SEQ ID NO: 3). Opcionalmente, por ejemplo, la bisagra comprende (por ejemplo, consiste en) la secuencia de aminoácidos de la bisagra de IgD (SEQ ID NO: 4). Opcionalmente, la bisagra puede ser una bisagra CD8 humana, o un fragmento de la misma. Opcionalmente, por ejemplo, la bisagra comprende (por ejemplo, consiste en) la secuencia de aminoácidos de la bisagra de CD8 (SEQ ID NO: 2). En la Tabla 5 se proporcionan secuencias adicionales de dominios bisagra ejemplares.

TCARS

Como se describe en el presente documento, la terapia celular CAR de la presente divulgación comprende un NKR-CAR en combinación con un TCAR. La terapia celular CAR de la presente divulgación comprende una célula que expresa NKR-CAR descrita en el presente documento que además comprende, por ejemplo, expresa un TCAR. Opcionalmente, la terapia celular CAR de la presente divulgación comprende una primera célula que expresa un NKR-CAR descrito en el presente documento y una segunda célula que expresa un TCAR.

Un TCAR comprende un dominio de unión a antígeno fusionado a un dominio intracelular, por ejemplo, un dominio citoplasmático. Un dominio citoplasmático comprende un dominio de señalización intracelular y produce una señal intracelular cuando un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, al que está fusionado se une a un contra ligando. Los dominios de señalización intracelular pueden incluir dominios de señalización intracelular primaria y dominios de señalización coestimuladora. Una molécula TCAR puede construirse para su expresión en una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T o una célula NK, de manera que la molécula TCAR comprende un dominio, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primario, un dominio de señalización coestimulador, un dominio inhibidor, etc., que se deriva de un polipéptido que se asocia típicamente con la célula inmunitaria. Por ejemplo, un TCAR para la expresión en una célula efectora inmune, por ejemplo, una célula T o célula NK, puede comprender un dominio 4-1BB y un dominio CD3 zeta. En este caso, tanto los dominios 4-1BB como CD3 zeta se derivan de polipéptidos asociados a la célula efectora inmunitaria, por ejemplo, la célula T o la célula NK. En otra realización, una molécula TCAR puede construirse para su expresión en una célula efectora inmune, por ejemplo, una célula T o una célula NK, de tal manera que la molécula TCAR comprende un dominio que se deriva de un polipéptido que no está típicamente asociado con la célula efectora inmune. Alternativamente, un TCAR para su expresión en una célula NK puede comprender un dominio 4-1BB y un dominio CD3 zeta derivado de una célula T (Véase, por ejemplo WO2013/033626).

Las siguientes secciones son relevantes para la construcción y expresión de los NKR-CARs y los TCARs descritos en el presente documento, y los procedimientos de uso de los mismos.

DOMINIO DE UNIÓN A ANTÍGENO

Los CARs descritos en el presente documento, por ejemplo, los KIR-CARs y los TCARs descritos en el presente documento, incluyen un dominio de unión a antígeno en la región extracelular. Un "dominio de unión a antígeno", tal y como se utiliza el término en este documento, se refiere a una molécula que tiene afinidad por un antígeno diana, normalmente un antígeno en una célula diana, por ejemplo, una célula cancerosa. Un dominio de unión a antígeno ejemplar comprende un polipéptido, por ejemplo, una molécula de anticuerpo (que incluye un anticuerpo, y fragmentos de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, una inmunoglobulina, un anticuerpo de dominio único (sdAb), y un scFv), o un andamio sin anticuerpo, por ejemplo, una fibronectina, y similares. Opcionalmente, el dominio de unión al antígeno es un único polipéptido. Opcionalmente, el dominio de unión al antígeno comprende uno, dos o más polipéptidos.

La elección de un dominio de unión a antígeno puede depender del tipo y número de ligandos o receptores que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede elegirse para reconocer un ligando o receptor que actúe como marcador de la superficie celular en las células diana asociadas a un estado de enfermedad concreto. Los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos o receptores incluyen un marcador de superficie celular asociado con un estado de enfermedad particular, por ejemplo, marcadores de superficie celular para enfermedades virales, enfermedades bacterianas infecciones parasitarias, enfermedades autoinmunes y trastornos asociados con la proliferación celular no deseada, por ejemplo, un cáncer, por ejemplo, un cáncer descrito en el presente documento.

En el contexto de la presente divulgación, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno proliferativo" o "antígeno asociado a un trastorno proliferativo" se refiere a los antígenos que son comunes a trastornos proliferativos específicos. En ciertos aspectos, los antígenos de trastornos proliferativos de la presente divulgación se derivan de cánceres que incluyen, pero no se limitan a, melanoma primario o metastásico, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón (por ejemplo, NSCLC o SCLC), cáncer de hígado, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, mieloma múltiple, glioblastoma, neuroblastoma, cáncer de útero, cáncer de cuello de útero, cáncer renal, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas como el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de colon y similares. En algunas realizaciones, el cáncer es una leucemia linfocítica aguda de células B ("BALL"), una leucemia linfocítica aguda de células T ("TALL"), una leucemia linfocítica aguda (ALL), una leucemia mielógena aguda (AML); una o más leucemias crónicas, incluyendo pero no limitándose a la leucemia mielógena crónica (CML), la leucemia linfocítica crónica (CLL); otros cánceres hematológicos o afecciones hematológicas, incluyendo, pero sin limitarse a ello, la leucemia prolinfocítica de células B, la neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, el linfoma de Burkitt, el linfoma difuso de células B grandes, el linfoma folicular, la leucemia de células pilosas, el linfoma folicular de células pequeñas o de células grandes, enfermedades linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom,

Opcionalmente, el antígeno tumoral comprende uno o más epítomos antigénicos del cáncer reconocidos inmunológicamente por los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) derivados de un tumor canceroso de un mamífero.

Los antígenos tumorales son proteínas producidas por las células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria, particularmente respuestas inmunitarias mediadas por células T. La selección del dominio de unión a antígeno de la divulgación dependerá del tipo particular de cáncer a tratar. Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica. Opcionalmente, el antígeno tumoral se elige entre un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), EGFRvIII, receptor de interleucina 11 alfa (IL-11Ra), subunidad del receptor de interleucina 13 alfa-2 (IL-13Ra o CD213A2), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), B7H3 (CD276), Kit (CD117), anhidrasa carbónica (CA-IX), CS-1 (también denominado subconjunto 1 de CD2), mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1), BCMA, proteína de fusión oncogénica formada por la región de la agrupación de puntos de ruptura (BCR) y el homólogo 1 del oncogén viral de la leucemia murina de Abelson (Abl) bcr-abl, Receptor tirosina-quinasa ERBB2 (HER2/neu), β -gonadotropina coriónica humana, alfafetoproteína (AFP), quinasa del linfoma anaplásico (ALK), CD19, CD123, ciclina B1, AFP reactiva a la lectina, antígeno relacionado con Fos 1, adrenoceptor beta 3 (ADRB3), tiroglobulina, tirosinasa; receptor de efrina tipo A 2 (EphA2), receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE-1), ubicuidad renal 1 (RU1), ubicuidad renal 2 (RU2), sarcoma sinovial, punto de ruptura X 2 (SSX2), proteína de anclaje de quinasa A 4 (AKAP-4), proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK), proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1), proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5), antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por las células T 3 (SART3), molécula similar a la lectina tipo C-1 (CLL-1 o CLECL1), fucosil GM1, porción hexasacárida de globoH glicoceramida (GloboH), MN-CA IX, molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM), EVT6-AML, transglutaminasa 5 (TGS5), transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT), ácido polisialico, específico de la placenta 1 (PLAC1), carboxil esterasa intestinal, antígeno LewisY, molécula de adhesión sialil Lewis (sLe), complejo de antígenos linfocíticos 6, locus K 9 (LY6K), proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2), M-CSF, homólogo derivado del neuroblastoma oncogénico viral de la mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN), Miembro de la familia Ras Homolog C (RhoC), Tyrosinaserelated protein 2 (TRP-2), Citocromo P450 1B1 (CYP1B1), Factor de unión a CCCTC similar a (proteína de dedos de zinc) (BORIS o hermano del regulador de sitios impresos), prostasa, antígeno específico de la próstata (PSA), proteína de caja emparejada Pax-3 (PAX3), fosfatasa ácida prostática (PAP), antígeno canceroso/testicular 1 (NY-ESO-1), antígeno canceroso/testicular 2 (LAGE-1a), LMP2, molécula de adhesión celular neural (NCAM), proteína tumoral p53 (p53), p53 mutante, Mutante del sarcoma de rata (Ras), glicoproteína 100 (gp100), prostestina, OR51E2, pannexina 3 (PANX3), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), antígeno de células madre de la próstata (PSCA), antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), Receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), receptor beta del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR-beta), legumina, virus del papiloma humano E6 (HPV E6), virus del papiloma humano E7 (HPV E7), survivina, telomerasa, proteína espermática 17 (SPA17), antígeno embrionario específico del estadio 4 (SSEA-4), tirosinasa, proteína del marco de lectura alternativo TCR Gamma (TARP), proteína del tumor de Wilms (WT1), antígeno tumoral del carcinoma de próstata-1 (PCTA-1), inhibidor de la apoptosis del melanoma (ML-IAP), MAGE, antígeno 1 asociado al melanoma (MAGE-A1), antígeno testicular del cáncer de melanoma-1 (MAD-CT-1), antígeno testicular del cáncer de melanoma-2 (MAD-CT-2), antígeno del melanoma reconocido por las células T 1 (MelanA/MART1), Familia de antígenos X, Miembro 1A

(XAGE1), factor de alargamiento 2 mutado (ELF2M), ERG (Gen de fusión TMPRSS2 ETS), N-acetilglucosaminiltransferasa V (NA17), elastasa de neutrófilos, puntos de corte de la translocación del sarcoma, antígeno de diferenciación de la glándula mamaria (NY-BR-1), efrinaB2, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD97, CD171, CD179a, receptor de andrógenos, factor de crecimiento de la insulina (IGF)-I, IGF-II, receptor IGF-I, gangliósido GD2 (GD2), gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2), gangliósido GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer), gangliósido GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer), receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D), receptor acoplado a proteína G 20 (GPR20), marco de lectura abierta del cromosoma X 61 (CXORF61), receptor de folato (FRa), receptor de folato beta, receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), tirosina quinasa tipo Fms 3 (Flt3), glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), antígeno Tn (TN Ag o (GalNAc α -Ser/Thr)), receptor de superficie celular de unión a angiopoyetina 2 (Tie 2), marcador endotelial tumoral 1 (TEM1 o CD248), marcador endotelial tumoral 7-relacionado (TEM7R), claudina 6 (CLDN6), receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHR), uroplakina 2 (UPK2), mesotelina, Proteasa serina 21 (Testisina o PRSS21), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP), receptor olfativo 51E2 (OR51E2), gen de translocación-variante ETS 6, localizado en el cromosoma 12p (ETV6-AML), CD79a; CD79b; CD72; Receptor similar a la inmunoglobulina asociada a los leucocitos 1 (LAIR1); Fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89); Receptor similar a la inmunoglobulina de los leucocitos, subfamilia A, miembro 2 (LILRA2); miembro de la familia f similar a la molécula CD300 (CD300LF); Dominio de lectina tipo C, familia 12 miembro A (CLEC12A); antígeno de células estromales de la médula ósea 2 (BST2); Módulo similar al EGF que contiene el receptor de la hormona similar a la mucina 2 (EMR2); antígeno linfocitario 75 (LY75); Glipicano-3 (GPC3); receptor Fc similar 5 (FCRL5); e inmunoglobulina lambda similar al polipéptido 1 (IGLL1). En una realización preferida, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en el receptor de folato (FRa), mesotelina, FGFRVIII, IL-13Ra, CD123, CD19, CD33, BCMA, GD2, CLL-1, CA-IX, MUC1, HER2, y cualquier combinación de los mismos.

Como se describe en el presente documento, el antígeno tumoral comprende uno o más epítomos antigénicos del cáncer asociados a un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir de antígenos objetivo para un ataque inmunitario. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan, a los antígenos específicos de los tejidos, como la MART-1, la tirosinasa y la GP 100 en el melanoma y la fosfatasa ácida prostática (PAP) y el antígeno específico de la próstata (PSA) en el cáncer de próstata. Otros antígenos diana incluyen moléculas relacionadas con la transformación, como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo de antígenos objetivo son los antígenos oncofetales, como el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de células B, la inmunoglobulina idiopática específica del tumor constituye un verdadero antígeno inmunoglobulínico específico del tumor que es único para el tumor individual. Los antígenos de diferenciación de las células B, como CD19, CD20 y CD37, son otros candidatos a antígenos diana en el linfoma de células B.

Los ejemplos no limitantes de antígenos tumorales incluyen los siguientes: Antígenos de diferenciación como MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos multilínea específicos del tumor como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados como CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorales únicos resultantes de translocaciones cromosómicas, como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos virales, como los antígenos EBVA del virus de Epstein Barr y los antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano. Otros antígenos grandes basados en proteínas son TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 \ proteína de unión a Mac-2 \ proteína asociada a ciclofilina TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

Dependiendo del antígeno deseado, el CAR de la divulgación puede ser diseñado para incluir el dominio de unión a antígeno apropiado que es específico para el antígeno deseado.

Dominios de unión a antígeno derivados de una molécula de anticuerpo

El dominio de unión al antígeno puede derivarse de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, uno o más de los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de un solo dominio, por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de, por ejemplo, origen humano o camélido. En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión a antígeno se derive de la misma especie en la que se utilizará finalmente el CAR, por ejemplo, para su uso en humanos, puede ser beneficioso que el dominio de unión a antígeno del CAR, por ejemplo, el KIR-CAR, por ejemplo, descrito en el presente documento, comprenda un dominio de unión a antígeno humano o humanizado. Los anticuerpos pueden obtenerse mediante técnicas conocidas en la técnica.

En ciertos aspectos, el scFv es contiguo con y está en el mismo marco de lectura que una secuencia líder. En un aspecto, la secuencia líder es la secuencia de aminoácidos proporcionada como SEQ ID NO:1.

En un aspecto, el dominio de unión a antígeno es un fragmento, por ejemplo, un fragmento variable de cadena única (scFv). En un aspecto, el dominio de unión al antígeno es un Fv, un Fab, un (Fab')₂, o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo, biespecífico) (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). En un aspecto, los

anticuerpos y fragmentos de los mismos de la divulgación se unen a una proteína de antígeno tumoral o a un fragmento de la misma con afinidad de tipo salvaje o mejorada.

En algunos casos, los scFv pueden prepararse según un procedimiento conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:5879-5883). Como se ha descrito anteriormente y en otros lugares, las moléculas de scFv pueden producirse uniendo las cadenas VH y VL en conjunto mediante enlazadores polipeptídicos flexibles. Como se describe en el presente documento, las moléculas de scFv comprenden un enlazador polipeptídico flexible con una longitud y/o composición de aminoácidos optimizada. La longitud del enlazador polipeptídico flexible puede afectar en gran medida a la forma en que se pliegan e interactúan las regiones variables de un scFv. De hecho, si se emplea un enlazador polipeptídico corto (por ejemplo, entre 5-10 aminoácidos, se evita el plegado intracadena. El plegado entre cadenas también es necesario para unir las dos regiones variables y formar un sitio funcional de unión al epítipo. Para ejemplos de la orientación y el tamaño de los enlazadores, véase, por ejemplo Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. ESTADOS UNIDOS. 90:6444-6448, Publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 y Publicación PCT n° WO2006/020258 y WO2007/024715.

Un scFv puede comprender un enlazador de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos de aminoácidos entre sus regiones VL y VH. La secuencia enlazadora puede comprender cualquier aminoácido de origen natural. Como se describe en el presente documento, el enlazador peptídico del scFv consiste en aminoácidos tales como residuos de glicina y/o serina utilizados solos o en combinación, para enlazar las regiones de cadena pesada variable y cadena ligera variable. Como se describe en el presente documento, el enlazador polipeptídico flexible es un enlazador Gly/Ser y, por ejemplo, comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser)_n, donde n es un número entero positivo igual o mayor que 1 (SEQ ID NO: 40). Por ejemplo, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 y n=6, n=7, n=8, n=9 y n=10. Como se describe en el presente documento, los enlazadores polipeptídicos flexibles incluyen, pero no se limitan a, (Gly4 Ser)₄ (SEQ ID NO: 27) o (Gly4 Ser)₃ (SEQ ID NO: 28). Como se describe en el presente documento, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly2Ser), (GlySer) o (Gly3Ser) (SEQ ID NO: 29).

Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno es una molécula de unión a antígeno de dominio único (SDAB). Una molécula SDAB incluye moléculas cuyas regiones determinantes complementarias forman parte de un polipéptido de dominio único. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, dominios variables de cadena pesada, moléculas de unión naturalmente desprovistas de cadenas ligeras, dominios únicos derivados de anticuerpos convencionales de 4 cadenas, dominios de ingeniería y andamios de dominio único distintos de los derivados de anticuerpos (por ejemplo, descritos con más detalle a continuación). Las moléculas SDAB pueden ser cualquiera del arte, o cualquier futura molécula de dominio único. Las moléculas SDAB pueden derivarse de cualquier especie, incluyendo, pero sin limitarse a, el ratón, el ser humano, el camello, la llama, el pez, el tiburón, la cabra, el conejo y el bovino. Este término también incluye las moléculas de anticuerpos de dominio único de origen natural procedentes de especies distintas de *los camélidos* y los tiburones.

Una molécula SDAB puede derivarse de una región variable de la inmunoglobulina que se encuentra en los peces, como, por ejemplo, la que se deriva del isotipo de inmunoglobulina conocido como Receptor de Antígeno Nuevo (NAR) que se encuentra en el suero del tiburón. Los procedimientos de producción de moléculas de dominio único derivadas de una región variable de NAR ("IgNARs") se describen en WO 03/014161 y en Streltsov (2005) Protein Sci. 14:2901-2909.

Una molécula SDAB es una molécula de unión a antígeno de dominio único que se produce de forma natural y que se conoce como cadena pesada desprovista de cadenas ligeras. Tales moléculas de dominio único se divulgan en WO 9404678 y Hamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448 por ejemplo. Por razones de claridad, este dominio variable derivado de una molécula de cadena pesada naturalmente desprovista de cadena ligera se conoce en el presente documento como VHH o nanocuerpo para distinguirlo del VH convencional de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Dicha molécula VHH puede provenir de especies de *Camelidae*, por ejemplo, en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies, además de *los Camelidae*, pueden producir moléculas de cadena pesada naturalmente desprovistas de cadena ligera; tales VHHs están dentro del alcance de la divulgación.

Opcionalmente, la molécula SDAB es un polipéptido de fusión de cadena única que comprende una o más moléculas de dominio único (por ejemplo, nanocuerpos), desprovisto de un dominio variable complementario o de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, Fc, que se une a uno o más antígenos diana.

Las moléculas de SDAB pueden ser recombinantes, injertadas con CDR, humanizadas, cameladas, desinmunizadas y/o generadas *in vitro* (por ejemplo, seleccionadas por visualización de fagos).

Opcionalmente, la porción de dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo humano o un fragmento del mismo.

Opcionalmente, un anticuerpo no humano se humaniza, donde secuencias o regiones específicas del anticuerpo se modifican para aumentar la similitud con un anticuerpo producido naturalmente en un humano. Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno está humanizado.

Los anticuerpos no humanos pueden humanizarse utilizando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, el injerto de CDR (véase, por ejemplo, la Patente Europea No EP 239.400 Publicación internacional nº WO 91/09967y Pat. de EE.UU. 5.225.539, 5,530,101y 5,585,089), el recubrimiento o el rejuvenecimiento (véase, por ejemplo Las patentes europeas nº EP 592.106 y EP 519.596 Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498 Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814y Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973), el barajado de cadenas (véase, por ejemplo U.S. Pat. Nº 5.565.332), y las técnicas divulgadas, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. No US2005/0042664, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. núm US2005/0048617, Pat. de EE. Nº 6.407.213, Pat. de EE.UU. Nº 5.766.886, Publicación internacional nº WO 9317105, Tan et al., 2002, J. Immunol., 169:1119-25 Caldas et al., 2000, Protein Eng., 13(5):353-60 Morea et al., 2000, Methods, 20:267-79 Baca et al., 1997, J. Biol. Chem, 272:10678-84 Roguska et al., 1996, Protein Eng., 9(10):895-904 Couto et al., 1995, Cancer Res., 55 :5973s-5977; Couto et al., 1995, Cancer Res., 55(8):1717-22 Sandhu 1994 Gene, 150(2):409-10y Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol., 235(3):959-73. A menudo, los residuos del marco en las regiones del marco serán sustituidos por el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, por ejemplo, mejorar la unión del antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de los CDR y los residuos del marco para identificar los residuos del marco importantes para la unión del antígeno y la comparación de secuencias para identificar los residuos del marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo Queen et al., U.S. Pat. Nº 5.585.089y Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323). En casos preferidos, la molécula de anticuerpo humanizado comprende una secuencia descrita en el presente documento, por ejemplo, una cadena ligera variable y/o una cadena pesada variable descrita en el presente documento, por ejemplo, una cadena ligera variable humanizada y/o una cadena pesada variable descrita en la Tabla 4.

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos suelen denominarse residuos de "importación", que suelen tomarse de un dominio variable de "importación". Así pues, los anticuerpos humanizados comprenden una o más CDR de moléculas de inmunoglobulina no humanas y regiones marco de humanos. La humanización de los anticuerpos es bien conocida en la técnica y puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter et al. (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986) Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988) Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias CDR o CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano, es decir, injerto de CDR (EP 239.400 Publicación PCT nº WO 91/09967y Pat. de EE.UU. Nº 4.816.567 6,331,415 5,225,539 5,530,101 5,585,089 6,548,640). En dichos anticuerpos quiméricos humanizados, se ha sustituido una cantidad sustancialmente menor de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de marco (FR) son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La humanización de los anticuerpos también puede lograrse mediante el recubrimiento o el resurgimiento (EP 592,106 EP 519.596 Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498 Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); y Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) o el barajado de cadenas (U.S. Pat. Nº 5.565.332).

Como se describe en el presente documento, el anticuerpo de la divulgación se prepara además utilizando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias VH y/o VL divulgadas en el presente documento puede utilizarse como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas en comparación con el anticuerpo de partida. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo se diseña modificando uno o más aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, VH y/o VL), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco.

En otro aspecto, el dominio de unión a antígeno es un receptor de células T ("TCR"), o un fragmento del mismo, por ejemplo, un TCR de cadena única (scTCR). Los procedimientos para hacer tales TCRs son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo Willemsen RA et al, Gene Therapy 7: 1369-1377 (2000) Zhang T et al, Cancer Gene Ther 11: 487-496 (2004) Aggen et al, Gene Ther. 19(4):3f65-74 (2012). Por ejemplo, se puede diseñar un scTCR que contenga los genes V α y V β de un clon de células T unidos por un enlazador (por ejemplo, un péptido flexible). Este enfoque es muy útil para la diana asociada al cáncer que en sí misma es intracelular, sin embargo, un fragmento de dicho antígeno (péptido) se presenta en la superficie de las células cancerosas por el MHC.

Una molécula NKR-CAR o TCAR descrita en el presente documento comprende un dominio de unión a antígeno que comprende un scFv que se une específicamente a un antígeno tumoral descrito en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos de los scFv que se unen específicamente a los antígenos tumorales descritos en el presente documento se proporcionan en la Tabla 4. Las CDR de las secuencias de scFv que figuran en la Tabla 4 están subrayadas. Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada pueden determinarse utilizando cualquiera de los esquemas de numeración conocidos, incluidos los descritos por Kabat o Chothia, o una combinación de los esquemas de numeración de Kabat y Chothia.

Las secuencias de scFv proporcionadas en la Tabla 4 comprenden una secuencia enlazadora que une las cadenas pesadas y ligeras variables de los scFv. La secuencia enlazadora puede ser cualquiera de las secuencias enlazadoras descritas en el presente documento, por ejemplo, una secuencia enlazadora proporcionada en la Tabla 5.

5 También se observa que algunas de las secuencias de scFv proporcionadas en la Tabla 4 comprenden además una secuencia líder, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, mientras que algunas de las secuencias de scFv proporcionadas en la Tabla 4 no comprenden una secuencia líder, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Las secuencias de scFv proporcionadas en la Tabla 4 con o sin una secuencia líder, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, también se incluyen en la divulgación. La persona experimentada podría utilizar fácilmente las secuencias proporcionadas en la Tabla 4 para generar scFvs o dominios de unión a antígeno de un CAR con o sin una secuencia líder, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Tabla 4: Dominios ejemplares de unión a antígenos

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD19	huscFv1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHYSRLHSGIPARFSGSGSTDYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPTFFGQGTKLEIKGGGSGGGGGGGGQVQLQESGGGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLLVTVSS	161
CD19	huscFv2	Eivmtqspatls spgeratls crasqdis kylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggggsggggqvqlqespgglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewivgsettyyqssllksrvtiskdnskqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydgqgtlvtvss	162
CD19	huscFv3	Qvqlqespgglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewivgsettyyqssllksrvtiskdnskqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydgqgtlvtvssggggsggggsei vmtqspatls spgeratls crasqdis kylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgtkleik	163
CD19	huscFv4	Qvqlqespgglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewivgsettyyqssllksrvtiskdnskqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydgqgtlvtvssggggsggggsei vmtqspatls spgeratls crasqdis kylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgtkleik	164
CD19	huscFv5	Eivmtqspatls spgeratls crasqdis kylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggggsggggqvqlqespgglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewivgsettyyqssllksrvtiskdnskqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydgqgtlvtvss	165
CD19	huscFv6	Eivmtqspatls spgeratls crasqdis kylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggggsggggqvqlqespgglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewivgsettyyqssllksrvtiskdnskqvslkssvtaadtavyycahyyyggsyamydgqgtlvtvss	166

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD19	huscFv7	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswlrpppgkglewigviwgse tlyysssllksrvtiskdnskngvslklsstvaadtavyycahkyyyggsyamdyw gggtlvtvssggggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlskra sqdiskynwyqqkpgqparlliyhtsrhsgiparfsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfgggtkleik	167
CD19	huscFv8	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswlrpppgkglewigviwgse tlyyqssllksrvtiskdnskngvslklsstvaadtavyycahkyyyggsyamdyw gggtlvtvssggggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlskra sqdiskynwyqqkpgqparlliyhtsrhsgiparfsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfgggtkleik	168
CD19	huscFv9	Eivmtqspatlspsgeratlskrasqdiskynwyqqkpgqparlliyhtsrh sgiparfsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggg ggggsgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlskra qppgkglewigviwgsettyynssllksrvtiskdnskngvslklsstvaadtav ycakhyyyggsyamdywggtlvtvss	169
CD19	HuscFv10	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswlrpppgkglewigviwgse tlyynssllksrvtiskdnskngvslklsstvaadtavyycahkyyyggsyamdyw gggtlvtvssggggsgggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlskra sqdiskynwyqqkpgqparlliyhtsrhsgiparfsgsgtdytlitisslqp edfavyfcqqgntlpytfgggtkleik	170
CD19	HuscFv11	Eivmtqspatlspsgeratlskrasqdiskynwyqqkpgqparlliyhtsrh sgiparfsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggg ggggsgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlskra glewigviwgsettyynssllksrvtiskdnskngvslklsstvaadtavyycah yyyyggsyamdywggtlvtvss	171
CD19	HuscFv12	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswlrpppgkglewigviwgse tlyynssllksrvtiskdnskngvslklsstvaadtavyycahkyyyggsyamdyw gggtlvtvssggggsgggsgggseivmtqspatlspsgeratlskrasqdis kynwyqqkpgqparlliyhtsrhsgiparfsgsgtdytlitisslqpedfav yfcqqgntlpytfgggtkleik	172

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD19	muCTL019	Diqmtqtstsslsaslgdrvtiscrasqdiskeylnwyqqkpdgtvkllyhtsrllh sgvpsrfsfgsgtdysltisnleqediatyfcqgqntlpytffgggkklleitggg gsgggsgggsvklqesgplvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirpprk glewlgviwgsettyynsalksrltiikdnskqvflkmnslqtdddtaiyycahh yygggyamdywgggtsvtvss	173
CD123	Mu1172	DIVLTQSPASLA VSLGQRA TISCRASEVDNYGNITFMHWYQQKPGQPPKLL LIYRASNLES GIPARFSGSRIDFTLTINPVEADDVATYYCQOSNEDPPTF GAGTKLELKG GGGGGGGGGGQQQLVQSGPELKKPGETVKISCKASG YIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWMGWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETS ASTAYLHINDLK NEDTATYFCARSGGYDPMDYWGQGTSTVTVSS	174
CD123	Mu1176	DVQITQSPSYLAASPGETTINCRAKSKISKDLAWYQEKPGKTNKLLIYSGS TLQSGIPSRFSGSGGIDFTLTISLEPEDFAMY CQOHNKYPTFGGGTK LEIKGGGGGGGGGGGQQQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTS YWMNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVVY CARGNWDYWGQGTSTVTVSS	175
CD123	huscFv1	Divltqspdsiavslgcratincrasevdyngntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgy pdrfsgsgrtdfl tisslqaedvavyyccqgsnedppifgggkklkiegsgsgsgsgsgsgsqqlvqsgselkkpgasvk sckasgyiftnygmnmwvrqapggglewmgwinty tgesty sadfkgrfvfslidtsvstaylqinalkaedlav yarsggydpmdywgqgtvtvss	176
CD123	huscFv2	Divltqspdsiavslgcratincrasevdyngntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgy pdrfsgsgrtdfl tisslqaedvavyyccqgsnedppifgggkklkiegsgsgsgsgsgsqqlvqsgaevkkpgasvk vscasgyiftnygmnmwvrqapggglewmgwinty tgesty sadfkgrvftidtsastay melssrscedlav yarsggydpmdywgqgtvtvss	177
CD123	huscFv3	Eivltqspatlsipgeratlscrasevdyngntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgiparfsgsgrtdfl stlepedvavyyccqgsnedppifgggkklkiegsgsgsgsgsgsqqlvqsgselkkpgasvk kasyiftnygmnmwvrqapggglewmgwinty tgesty sadfkgrfvfslidtsvstaylqinalkaedlav arsggydpmdywgqgtvtvss	178
CD123	huscFv4	Eivltqspatlsipgeratlscrasevdyngntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgiparfsgsgrtdfl stlepedvavyyccqgsnedppifgggkklkiegsgsgsgsgsgsqqlvqsgaevkkpgasvk ckasgyiftnygmnmwvrqapggglewmgwinty tgesty sadfkgrvftidtsastay melssrscedlav arsggydpmdywgqgtvtvss	179

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD123	huscFv5	Qiqlvqsgscilkpgeasvkvsckasgyifinygmnwvrrqapqgqlwmgwinytgestysadfkgrfvfsl disystaylqimalkaedtavyycarsgydpmndywgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsgsgsdvllqsp pdslavslgeratincrasesydnyngtfmlhwyqqkpgqppklliyrasnlesgyprdfsgsgrtdftllsslqac dvavyyccqsnedppifgggkileik	180
CD123	huscFv6	Qiqlvqsgscilkpgeasvkvsckasgyifinygmnwvrrqapqgqlwmgwinytgestysadfkgrfvfsl disystaylqimalkaedtavyycarsgydpmndywgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsgsdvllqsp atlspsgeratincrasesydnyngtfmlhwyqqkpgqppklliyrasnlesgyprdfsgsgrtdftllsslqacdv avyyccqsnedppifgggkileik	181
CD123	huscFv7	Qiqlvqsgaevkpkpgasvkvsckasgyifinygmnwvrrqapqgqlwmgwinytgestysadfkgrvtitld tsastaymelsslrscdtavyycarsgydpmndywgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsdvllqsp dslavslgeratincrasesydnyngtfmlhwyqqkpgqppklliyrasnlesgyprdfsgsgrtdftllsslqacdv vavyyccqsnedppifgggkileik	182
CD123	huscFv8	Qiqlvqsgaevkpkpgasvkvsckasgyifinygmnwvrrqapqgqlwmgwinytgestysadfkgrvtitld	183
CD123	Humano 123-1	tsastaymelsslrscdtavyycarsgydpmndywgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsdvllqsp tllspgeratincrasesydnyngtfmlhwyqqkpgqppklliyrasnlesgyprdfsgsgrtdftllsslqacdv vavyyccqsnedppifgggkileik	184
CD123	Humano 123-2	MALPVTALLLP LALLLHAARPOVLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTGYMHWVROA PGGLEWGMWINPNSGGTNYAQKFGGRVTWTRDTSI STAYMELSLRSLRSDDTAVYYCARDMN ILATVPFDIWGQGTMTVTVSSGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRAS QSISSYLNWYQOKPKGKAPNLLIYAAFSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTVNSLQPEDFATYY CQQGDSVPLTFGGGTKLEIK	185
CD123	Humano 123-3	MALPVTALLLP LALLLHAARPOVLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTGYMHWVROA PGGLEWGMWINPNSGGTNYAQKFGGRVTWTRDTSI STAYMELSLRSLRSDDTAVYYCARDMN ILATVPFDIWGQGTMTVTVSSGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRAS QSISSYLNWYQOKPKGKAPNLLIYAAFSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTVNSLQPEDFATYY CQQGDSVPLTFGGGTKLEIK	186

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD123	Humano 123-4	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPKGASVKVYCKASGYTFDTYYMHWLRQA PGQGLEWMGRINPNAGTNYAOKFQGRVTLTRDTISITVVMELSLRSDDDTAVYYCARDMN ILATVPFDIWGQGTMTVTVSSASGGGGGGRRASGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCR ASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPRFRFSGSGGTFTLTISLQPEDFAT YYCQQGDSVPLTFGGGTKVEIK	187
CD123	hzCAR-1	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPKGASVKVYCKASGYTFDTYYMHWLRQA PGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARGNW DDYWGQGTMTVTVSSGGGGGGGGGGGGSDVQLTQSPFLSASVGDRTVITCRASK SISKDLAWYQQKPKAPKLLIYSGSTLQSGVPRFRFSGSGGTFTLTISLQPEDFATYYC QQHNKYPTTFGGGTKVEIK	188
CD123	hzCAR-2	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPKGASVKVYCKASGYTFDTYYMHWLRQA APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTMTVTVSSGGGGGGGGGGGGSDVQLTQSPFLSASVGDRTVITCRASK ASKSISKDLAWYQQKPKAPKLLIYSGSTLQSGVPRFRFSGSGGTFTLTISLQPEDFA VYYCQQHNKYPTTFGGGTKVEIK	189
CD123	hzCAR-3	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPKGASVKVYCKASGYTFDTYYMHWLRQA APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTMTVTVSSGGGGGGGGGGGGSDVAVMTQSPFLSVPTEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPKAPKLLIYSGSTLQSGVPRFRFSGSGGTFTLTISLQAEADA TYYCQQHNKYPTTFGGGTKVEIK	190
CD123	hzCAR-4	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPKGASVKVYCKASGYTFDTYYMHWLRQA APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTMTVTVSSGGGGGGGGGGGGSDVAVMTQSPDLSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPKAPKLLIYSGSTLQSGVPRFRFSGSGGTFTLTISLQAEADVA VYYCQQHNKYPTTFGGGTKVEIK	191
CD123	hzCAR-5	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPKGASVKVYCKASGYTFDTYYMHWLRQA PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPRFRFSGSGGTFTLTISLQPEDFATYYCQQHNKYPTTFG GGTKVEIKGGGGGGGGGGGGGGGGGGVQLVQSGAEVKKPKGASVKVYCKASGYTFTSY WMMWVRQAFQGGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTMTVTVSS	192
CD123	hzCAR-6	MALPVTALLPLALLHAARPEVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGVPRFRFSGSGGTFTLTISLQPEDFATYYCQQHNKYPTTFG GGTKVEIKGGGGGGGGGGGGGGGGGGVQLVQSGAEVKKPKGASVKVYCKASGYTFTSY WMMWVRQAFQGGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTMTVTVSS	193

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD123	hzCAR-7	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGSEELKPKPGASVKVSKASGYTFTSYMMNWRQ PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLAEADAATYYCQQHINKYPYTFG GGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGQVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYTFTSY WMNWRQAPGGLEWMMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNDDYWGQGTTFVYSS	194
CD123	hzCAR-8	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGSEELKPKPGASVKVSKASGYTFTSYMMNWRQ PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLAEADAVYYCQQHINKYPYTFG GGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGQVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYTFTSY WMNWRQAPGGLEWMMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA	195
		VYYCARGNDDYWGQGTTFVYSS	
CD123	hzCAR-9	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGSEELKPKPGASVKVSKASGYTFTSYMMNWRQ APGQGLEWMMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEEDTAVYYCARG NDDYWGQGTTFVYSSGGSGGGSGGGSGGGQVQLTQSPFLSASVYDRVTITCR ASKISKDLAWYQOKPKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHINKYPYTFGGGTKVEIK	196
CD123	hzCAR-10	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGSEELKPKPGASVKVSKASGYTFTSYMMNWRQ APGQGLEWMMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEEDTAVYYCARG NDDYWGQGTTFVYSSGGSGGGSGGGSGGGQVQLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASKISKDLAWYQOKPKAPKLLIYSGSTLQSGIIPARFSGSGSGTFTLTISSLQPEDFA VYYCQQHINKYPYTFGGGTKVEIK	197
CD123	hzCAR-11	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGSEELKPKPGASVKVSKASGYTFTSYMMNWRQ APGQGLEWMMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEEDTAVYYCARG NDDYWGQGTTFVYSSGGSGGGSGGGSGGGQVVMTQSPAFLSVTPGKVTITCR ASKISKDLAWYQOKPKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLAEADAA TYYCQQHINKYPYTFGGGTKVEIK	198
CD123	hzCAR-12	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGSEELKPKPGASVKVSKASGYTFTSYMMNWRQ APGQGLEWMMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEEDTAVYYCARG NDDYWGQGTTFVYSSGGSGGGSGGGSGGGQVVMTQSPDLSLAVSLGERATINCR ASKISKDLAWYQOKPKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFFTLTISSLQAEEDVA VYYCQQHINKYPYTFGGGTKVEIK	199

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD123	hzCAR-26	MALPVTALLPLALLHARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTYFTSYWMNWRQ APGKGLVWYSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGT ^T VTVSYSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSRAEDTAVYYCARG ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLIIYSGSTLQSGI ^T PARFSGSGGTDFTLTISILEPEDEFA VYCCQQHNKYPYTFGGGT ^K VEIK	213
CD123	hzCAR-27	MALPVTALLPLALLHARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTYFTSYWMNWRQ APGKGLVWYSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGT ^T VTVSYSGGGSGGGSGGGSDVVMVQSPAFLSVTPGKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISILEAEDAA TYCCQQHNKYPYTFGGGT ^K VEIK	214
CD123	hzCAR-28	MALPVTALLPLALLHARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTYFTSYWMNWRQ APGKGLVWYSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGT ^T VTVSYSGGGSGGGSGGGSDVVMVQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQAEDEVA VYCCQQHNKYPYTFGGGT ^K VEIK	215
CD123	hzCAR-29	MALPVTALLPLALLHARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSRAEDTAVYYCARG PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGGTEFTLTISLQPEDFATYCCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSRAEDTAVYYCARG WMNWRQAPGKGLVWYSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNLSRAEDTA VYCCARGNWDYWGQGT ^T VTVSS	216
CD123	hzCAR-30	MALPVTALLPLALLHARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSRAEDTAVYYCARG PGQAPRLIIYSGSTLQSGI ^T PARFSGSGGTDFTLTISILEPEDFAVYCCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSRAEDTAVYYCARG WMNWRQAPGKGLVWYSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNLSRAEDTA VYCCARGNWDYWGQGT ^T VTVSS	217
CD123	hzCAR-31	MALPVTALLPLALLHARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSRAEDTAVYYCARG PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISILEAEDAATYCCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSRAEDTAVYYCARG WMNWRQAPGKGLVWYSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNLSRAEDTA VYCCARGNWDYWGQGT ^T VTVSS	218
CD123	hzCAR32	MALPVTALLPLALLHARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSRAEDTAVYYCARG PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQAEDEVAVYCCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSRAEDTAVYYCARG WMNWRQAPGKGLVWYSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNLSRAEDTA VYCCARGNWDYWGQGT ^T VTVSS	219

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos (continuación)	SEQ ID NO:
EGFR VIII	huscFv1	Eiqlvqsgaevkkgatvkiskgsgfniedyihwvqqapkgglewmgndpendctkypifqgrvitad tsintvymlsrlsredtavycalfrggyvwgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsgsdvymtqspdsia vslgeratinckssqslldsdktylnwlqkpgqppkrlisvskldsgvpdrfsrgsgtdftitisslqaedvavy ycwqgthfpgtfggatkveik	220
EGFR VIII	huscFv2	Dvymtqspdslavslgeratinckssqslldsdktylnwlqkpgqppkrlisvskldsgvpdrfsrgsgtdf tltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggatkveikggsgsgsgsgsgsgsgsgsdvymtqspdsia kiskgsgfniedyihwvqqapkgglewmgndpendctkypifqgrvitadistintvymelsrlsredtav ycalfrggyvwgqgtvtvss	221
EGFR VIII	huscFv3	Eiqlvqsgaevkkgatvkiskgsgfniedyihwvqqapkgglewmgndpendctkypifqgrvitad tsintvymlsrlsredtavycalfrggyvwgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsdvymtqspdsia vslgeratinckssqslldsdktylnwlqkpgqppkrlisvskldsgvpdrfsrgsgtdftitisslqaedvavy ycwqgthfpgtfggatkveik	222
EGFR VIII	huscFv4	Dvymtqspdslavslgeratinckssqslldsdktylnwlqkpgqppkrlisvskldsgvpdrfsrgsgtdf tltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggatkveikggsgsgsgsgsgsgsgsdvymtqspdsia kiskgsgfniedyihwvqqapkgglewmgndpendctkypifqgrvitadistintvymelsrlsredtav ycalfrggyvwgqgtvtvss	223
EGFR VIII	huscFv5	Eiqlvqsgaevkkgatvkiskgsgfniedyihwvqqapkgglewmgndpendctkypifqgrvitad tsintvymlsrlsredtavycalfrggyvwgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsdvymtqspdsia vslgeratinckssqslldsdktylnwlqkpgqppkrlisvskldsgvpdrfsrgsgtdftitisslqaedvavy ycwqgthfpgtfggatkveik	224
EGFR VIII	huscFv6	Eiqlvqsgaevkkgatvkiskgsgfniedyihwvqqapkgglewmgndpendctkypifqgrvitad tsintvymlsrlsredtavycalfrggyvwgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsdvymtqspdsia vslgeratinckssqslldsdktylnwlqkpgqppkrlisvskldsgvpdrfsrgsgtdftitisslqaedvavy ycwqgthfpgtfggatkveik	225
EGFR VIII	huscFv7	Dvymtqspdslavslgeratinckssqslldsdktylnwlqkpgqppkrlisvskldsgvpdrfsrgsgtdf tltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggatkveikggsgsgsgsgsgsgsgsdvymtqspdsia kiskgsgfniedyihwvqqapkgglewmgndpendctkypifqgrvitadistintvymelsrlsredtav ycalfrggyvwgqgtvtvss	226

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
mesotelina	M2 (humano)	QVQLVQSGAEVKKFGASVKVCKASVGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS GGTN YAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELSLRLRSDDDTAVYICARDLRRITVTPRAY YGM DVWGQGT TVVSSGGGGGGGGGGGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGD RV TITCRASQDI SNSLNWYQQKAGKAPKLLI YDASTLETGVPSPRFSGGSGTDFSTFT ISSLQPEDIAIYCYCQ QHDN LPLTFGGG TKVEIK	231
mesotelina	M3 (humano)	QVQLVQSGAEVKKFGAPVKVCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS GGTN YAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELSLRLRSDDDTAVYICARGEWDGSIYYDIW GQGT LVTVSSGGGGGGGGGGGGGGSDI VLQT PSLSASVGD RVTIT CRASQ DI SQSINT YLNWYQQKAGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGGSGTDFLLTISLQ EDFATYCYCQ QSF PLTFGGG TKLEIK	232
mesotelina	M4 (humano)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYMMHWVRQVPGKGLVWVSRINTDG STTT YADSV EGRFTISRDN AKNTLYLQ MNSLRDDDDTAVYICVGGHWAVWGQGTIV TVSSGGGGGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGD RVTITCRASQ SDI RLAWY QQKPGKAPKLLI YKASSLESVPSRFSGGSGTEFTLTISSLQ PD DFAVY YCY QY GHLLPMTYTFGGG TKVEIK	233
mesotelina	M6 (humano)	QVQLVQSGAEVKKFGASVKVCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSSG GSTS YAQKFQGRVTMTRDTSI TVYME LSLR SEDTAVYICARYRLIAVAGDYIY YGM DVWGQGT MTVTVSSGGGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGD RV TITCRASQGVGRWLA WYQQKPGTAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGGSGTDFTLT INN LQ PEDFATYCYCQ QANS FPLTFGGG TRLEIK	235
mesotelina	M7 (humano)	QVQLVQSGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSL RAEDTAVYICARWVSSSSPAFDY WGQGT LVTVSSGGGGGGGGGGGGGGSEI VLQSPATLSLSPGERAILS CR ASQSVYT KYLGWYQQKPGQAPRLLI YDASTRATGIPDRFSGSGSGTDFLLTINRL EPEDFAVYCYC QHYGG PLITFGG GTRLEIK	236
mesotelina	M8 (humano)	QVQLQQSGAEVKKFGASVKVCKTSGYPFTGYSLHWVRQAPGQGLEMMGWINPNS GGTN YAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELSLRLRSDDDTAVYICARDHYGNSLFIYWG QGT LVTVSSGGGGGGGGGGGGGGSDI QLTQSPSSI SASVGD TVSI TCRAS QDSGTWLA WYQQKPGKAPNLLMYDASTLE DGVPSRFSGSASGTEFTLITVNR LQPE DSATYCYC QYNS YPLTFGGG TKVDIK	237

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
mesotelina	M9 (humano)	QVQLVQSGAEVKKPQASVEVCKASVGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPFG GSTGYAOKFQGRVTMTDSTSTVHMELSLRSEDVAVYCARGGYSSSDAFDI WGQGTMTVSSGGGGGGGGGGGGGGDIQMTQSPPSLASVGDRTVITCR ASQDISSALAWYQQKPTPKLLIYDASSLESVPSRFRSGSGGDTFTLTISSLQ PEDFATYCCQYQSYPLTFGGTRLEIK	238
mesotelina	M10 (humano)	QVQLVQSGAEVKKPQASVKVCKASVGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGIISAYN GNTNYAQKLGQGRVTMTDSTSTAYMELRLSRDSDTAVYCARVAGGIYYIYGMQ VMGQGTITITVSSGGGGGGGGGGGGGGDI VMTQTPDLSAVSLGERATISC KSSHSLVLYNRNKNYLAWYQQKPGQPKLLIFYWASTRKS GV DRFRSGSGGDTFT LTISSLQPEDFATYCCQYQSYPLTFGGTRLEIN	239
mesotelina	M12 (humano)	QVQLVQSGAEVKKPQASVKVCKASVGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGRINPNS GNTNYAQKFGQGRVTMTDSTSTAYMELRLSRDSDTAVYCAR TT TSYAFDIWGQ GTMVTVSSGGGGGGGGGGGGGGDIQLTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQ SISTWLAWYQQKPGKAPNLLIYKASTLESVPSRFRSGSGGTEFTLTISSLQPPDD FATYCCQYNTYSPYTFGQGTLEIK	241
mesotelina	M13 (humano)	QVQLVQSGGGLVFPGGSLRSCASGFI F SDYMGWIRQAPGKGLEWVSYIGRSG SSMYADSVKGRFTFSRDNAKNSLYLQMN S LR A EDTAVYCAASPVVAATEDFQH WGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGDI VMTQTFATLSLSPGERATLSCR ASQSVTSNYLAWYQQKPGQAPRLLIFGASTRATGI P DRFRSGSGGDTFTLTIINRL EPEDFAMYCCQYGSAPVTFGQGTLEIK	242
mesotelina	M14 (humano)	QVQLVQSGAEVRA P QASVKISCKASGFTFRGYI H WVRQAPGQGLEWMGIINPFG GSRAYAQKFGQGRVTMTDSTSTVYMELSLRSDDTAM Y CARTASCGGDCYILD	243
		YWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGDIQMTQSPPTLSASVGDRTVITC RASENVNIWLAWYQQKPGKAPKLLIYKSSSLASGVPSRFRSGSGGAEFTLTISSL QPDDFATYCCQYQSYPLTFGGTKVDIK	
mesotelina	M15 (humano)	QVQLVQSGGGLVQFRSLRSLCAASGTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNS GSI G YADSVKGRFTISRDN A KN S LYLQMN S LR A EDTAVYCAKDGSSSWSWGDFD YWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGSELTQDP A V S VALGQTVRTTCQGDALR SYASWYQQKPGQAPMLVIYGN N RPSGI P DRFRSGSDSGTASLTIITGAQAEDEA DYCN S RDS S SGYPVFGTGT K VTVL	244

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
mesotelina	M16 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNS GSTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDSWYGGGSAF DIWGQGTMTVTVSSGGGGGGGGSSSELTQPAVSVLQGTIVRITCQGDLSL RSYYASWYQQKPKGQAPLVIFGRSRRRPSGIPDRFSSSGNTASLTIITGAQAEDE ADYYCNSRDNTANHYVFGTGLTVL	245
mesotelina	M17 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNS GSTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDSWYGGGSAF DIWGQGTMTVTVSSGGGGGGGGSSSELTQPAVSVLQGTIVRITCQGDLSL RSYYASWYQQKPKGQAPLVIFGRSRRRPSGIPDRFSSSGNTASLTIITGAQAEDE ADYYCNSRSGSSGNHYVFGTGLTVL	246
mesotelina	M18 (humano)	QVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMHVWRQAPGKGLVWVSRINSDG SSTSADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVRTGWVGSYYYMD VWGKGTITVTVSSGGGGGGGGSSSELTQPAVSVLQGTIVRITCQGDLSL RASQSVSNLYLAWYQQKPKGQAPLVIFGRSRRRPSGIPDRFSSSGNTASLTIITSS LEPEFAVYYCQQRSNWPPWTFGQGTKVEIK	247
mesotelina	M19 (humano)	QVQLVQSGGGVQVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVIYDYG SNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGYRYYYGMDEV WGQGTITVTVSSGGGGGGGGSSSELTQPAVSVLQGTIVRITCQGDLSL ASQSVYTKYLGWYQQKPKGQAPLVIFGRSRRRPSGIPDRFSSSGNTASLTIINRL EPEDEFAVYYCQHYGGSLITFGQGTKVDIK	248
mesotelina	M20 (humano)	QVQLVQSGGGVQVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSG GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKREAAAGHDWYFD LWGRGTLVTVSSGGGGGGGGSSSELTQPAVSVLQGTIVRITCQGDLSL RASQSVSNLYLAWYQQKPKGQAPLVIFGRSRRRPSGIPDRFSSSGNTASLTIINRL QPEDEFAVYYCQQSYSIPLTFGQGTKVEIK	249
mesotelina	M21 (humano)	QVQLVQSWAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMMGLINPSSG GSTSYAQKFKQGRVTMTTRDTSITVYMELSNLRSDEAVYYCARSPRVTITGYFDYW GQGTITVTVSSGGGGGGGGSSSELTQPAVSVLQGTIVRITCQGDLSL SOSISSWLAWYQQKPKGQAPLVIFGRSRRRPSGIPDRFSSSGNTASLTIINRL DDFAVYYCQQYSSYPLTFGGGTRLEIK	250

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CLL-1	139117 (humano)	EVQLQSGGFLVQPGGSLRLSCTCTVSGGPRVSRGSHYWNWIRQPPGRGLEWVIGYIYYSGSTNY NPSLENRVTSIDTSSNHFSLKLSVTAADTALYFCARGATFDWNFYDFDWSGQGLVTVS SGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPKAP LLIYAASSLQSGVPSRFSGGSGTDFLLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFWTFGGTKLEI K	258
CLL-1	139119 (humano)	QVQLQESGGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYSWIRQPPGKGLEWVGINHSGSTNYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARGGIVVYAIRVSGMFDYWGQGLV TVSSGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPKGK APKLLMYAASSLQSGVPSRFSGGSGTDFLLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFWTFGGT KVDIK	259
CLL-1	139120 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVROAPGKGLEWVSISSSSYIYZA DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYCARDPSSSGSYMEDSYYYGMDVWGQ TTVTSSGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPKGK RPGSAFTTVIYEDNQRESGVPDRFSGSDSSNSASLTIISGLKTEDEADYCCQSYDSSNOV VFGGTKLTVL	260
CLL-1	139121 (humano)	QVNLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVROAPGKLEWVSISSSGSTIYZA DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYFCAREALGSSWEGQGTFTVTVSSGGGGS GGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYDA SNLETGVPSPRFSGGSGTDFLLTISLQPEDIATYYCQQYDNLPLTFGGGKLEIK	261
CLL-1	146259 (humano)	QVQLVQSGAEYKPEGASVKVCSKAPANTFSDHYMHWVROAPGQRFEMWYIHAANGGTHYS QKFDRTVITRDTSANTRYMDLSSLRSEDTAVYFCARGGINSDFDIWGQGTMTVTVSSGGG GSGGGGGGGSDIQMTQSPSSYSASVGDRTVITCRASQDISSMLAWYQQKPKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGGSGTDFLLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFWTFGGTKVE IK	262
CLL-1	146261 (humano)	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVROAPGKLEWVSISSSSSTIYZA DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYFCARDLSVRAIDAFDIWGQGTMTVTVSSG GGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISSYLNWYQQKPKGK APKLLIYDASNLETGVPSPRFSGGSGTDFLLTISLQPEDFATYYCQQAYSTPFWTFGGTK VEIK	263
CLL-1	146262 (humano)	EVQLVQSGGAVVRSRSLRLSCAASGFTFNSYGLHWVROAPGKLEWVALIEYDGSNKYYG DSVKGRFTISRDKSKTLYLQMDNLSRAEDTAVYFCAREGNEDLAFDIWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQFIKKNLNWYQKPKAP KLLIYDASSLQSGVPSRFSGNSGTTFTISLQPEDVATYYCQQHNDLPLTFGGTKVE IK	264

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CLL-1	146263 (humano)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGENYVSNTWVRRQAPGKLEWVSVIYSGGATFYGD SVKGRFTVSRDNSKNTVYLQMNRLTAEDTAVYCARDRLYCGNCCYLYYYGMDVWGQGTLL VTVSSGGGGGGGGGGGGDIQVTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNIWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFITLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPL TFGGGTKVEIK	265
CLL-1	146264 (humano)	QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYPTFGYIQLMVRQAPGGLEMMGWLDPNSGNTGYA QKFGGRVTMRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYCASDSYGYGMDVWGQGTLLVTVSSGG GGGGGGGGGGGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSALAWYQQKPGKPK PKLLIYDASSLESVPSRFSGSGGTDFITLTISLQPEDFATYYCQGFENNYEPLTFGGGTKV EIK	266
CLL-1	181268 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSEYMNWVRQAPGKLEWVSVIYSSGGTIYYA DSVKGRTI SRDIAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYCARDPYSSSHDAFDIHWGQGTMTVTVSS GGGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR	267
		LLIYGASRRATGIPDRFSGSGGTDFITLTISRLEPEDFAVYCCQYIGSSPLTFGGGTKVDI K	
BCMA	139103 (humano)	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNAYMWRQAPGKLGWVSGISRSRGGENTYYA DSVKGRTI SRDIAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYCARSPAHYGGMDVWGQGTMTVTVSSAS GGGGGGGGGGGGGGDIQVTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSISSFLAWYQQKPGQAPR LLIYGASRRATGIPDRFSGSGGTDFITLTISRLEPEDFAVYCCQYHSSPSWTFGGGTKLE IK	268
BCMA	139105 (humano)	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSVIYSSGGIYGA DSVKGRTI SRDIAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYCSVHSELYWGGQGTMTVTVSSASGGGG GGRASGGGGDI VMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSGNYLDWYLQKPGQSPQL LIYLGSRASGVDRFSGSGGTDFITLTI SRVEAEDVGVYCMQALQTPYTFGGGTKVEIK	269
BCMA	139111 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSDFALSNHGMWVRQAPGKLEWVSVIYSSGGTYAA SVKGRFTI SRDIAKNSLYLQMNRLRAEDTAVYCSAHGSDVWGQGTMTVTVSSASGGGG GGRASGGGGDI VMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLENDGKPTLWYIWKAGQPPQL LIYEVSNRPSGVPDRFSGSGGTDFITLTI SRVEAEDVGVYCMQNTI QFPSPGGGTKLEIK	270
BCMA	139100 (humano)	QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYIFNFGINWVRQAPGGLEMMGWINPKNNNTNYA QKFGGRVTI TADESTNTAYMEVSSLRSEDTAVYCARPYYIQSYMDVWGQGTMTVTVSSAS GGGGGGGGGGGGGGDI VMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSGNYLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSRASGVDRFSGSGGTDFITLTI TRVGAEDVGVYCMQALQTPYTFGGGT KLEIK	271

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
BCMA	139101 (humano)	QVQLVQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDAITWVROAPGKGLEWVSVISGSGGTTIYYA DSVKGRFTI SRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLDSSGGYYIYARPRYWGQGTLLVTVS SASGGGGGRASGGGSDIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSISSYLINWYQKPKGKA PKLLIYGASTLASGVPARFSGSGGTHFTLTIINSLQSEDSATYYCQSYKRASFGQGTKVE IK	272
BCMA	139102 (humano)	QVQLVQSGAEVKKPKASVKVCKASGYTFSNYGITWVROAPGQGLEWMMWISYNGNTNVA QKFGQRTVTRNTSISTAYMELSSLRSSEDTAVYYCARGPYIYMDVWVGKMTVTVSSASGG GGGGRASGGGSEIVMTQSPSLPVTPEGPASISCRSSQSLLYSNGINVDWYLQKPGQS PQLLIYLGSNRRASGVPDRFSGSGGTDFKLQISRVEAEDVGIYYCQGRQFFYSFGQGTKV EIK	273
BCMA	139104 (humano)	EVQLLETTGGGLVQPGGSLRLSCAVSGEALSNHGMSWRRAPGKLEWVSGIVYSGSTIYAA SVKGRFTISRDN SRNTLYLQMN SLRPEDTALYYCSAHGGESDVWGQGTITVTVSSASGGGS GGRASGGGSEIVLQSPATLSVSPGESATLSRASQSYSSNLAWYQKPKGQAPRLLIYGA STRASGIPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEADVAVYYCQYGGSSITFGGKVEIK	274
BCMA	139106 (humano)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGEALSNHGMSWRRAPGKLEWVSGIVYSGSTIYAA SVKGRFTISRDN SRNTLYLQMN SLRPEDTALYYCSAHGGESDVWGQGTITVTVSSASGGGS GGRASGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSRASQSYSSKLAWYQKPKGQAPRLLMYGA SIRATGIPDRFSGSGGTEFTLTISSLPEPEFAVYYCQYGGSSSWTFFGQGTKVEIK	275
BCMA	139107 (humano)	EVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCAVSGEALSNHGMSWRRAPGKLEWVSGIVYSGSTIYAA SVKGRFTISRDN SRNTLYLQMN SLRPEDTALYYCSAHGGESDVWGQGTITVTVSSASGGGS GGRASGGGSEIVLQSPGTLSPGERATLSRASQSYGSLNLAWYQKPKGQAPRLLIYD ASNRATGIPDRFSGSGGTDFTLTI SRLEPEDEFAVYYCQYGGSSPPTFFGQGTKVEIK	276
BCMA	139108 (humano)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYMSWIRQAPGKLEWVSVISGSGSTIYYA DSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARESDGMDVWGQGTITVTVSSASGGG GGGRASGGGSDIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSISSYLINWYQKPKGAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDEFAVYYCQSYSSYTLAIFGQGTKVDIK	277
BCMA	139109 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGEALSNHGMSWRRAPGKLEWVSGIVYSGSTIYAA SVKGRFTISRDN SRNTLYLQMN SLRPEDTALYYCSAHGGESDVWGQGTITVTVSSASGGGS GGRASGGGSDIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSISSYLINWYQKPKGAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDEFAVYYCQSYSTPYTFFGQGTKVEIK	278
BCMA	139110 (humano)	QVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYMSWIRQAPGKLEWVSVISGSGNTIYYA DSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSTVREDYWGQGTITVTVSSASGGG GGGGRASGGGSDIVLQSPSLPVTLQGPASISCKSSSESLVHNSGKTYLNWFHQRPGQSP RRLIYEVSNRD SGVDRFTFGSGGTDFTLTI SRVEAEDVGIYYCQGTIHWFGTFFGQGTKLE IK	279

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos (continuación)	SEQ ID NO:
BCMA	139112 (humano)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWRRAPGKLEWVSGIVYSGSTYYAA SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAIYCSAHGGEDEVWGGQTITVTVSSASGGGGS GGRASGGGSDIRLITQSPFLSASVGDRTITCQASEDINKFLNWFHTPGKAPKLLIYDA .STLQGVPSRFRSGSGGSDFTLITINSLQPEDIGTYICQYQYELPLTFGGGKVEIK	280
BCMA	139113 (humano)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWRRAPGKLEWVSGIVYSGSTYYAA SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAIYCSAHGGEDEVWGGQTITVTVSSASGGGGS GGRASGGGSEITLITQSPATLSVSPGERATLSCRASQVGSNLAWYQOKPGQGRLLIYGA.	281
		STRATGIPARFSGSGGTEFTLITISSLQPEDFAVYCYQYNDWLPVTFGGGKVEIK	
BCMA	139114 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWRRAPGKLEWVSGIVYSGSTYYAA SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAIYCSAHGGEDEVWGGQTITVTVSSASGGGGS GGRASGGGSEIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQISGSLSLAWYQOKPGQAPRLLMYG .ASSRASGIPDRFSGSGGSDFTLITISRLPEDEFAVYCYQYAGSPPPTFGGGKVEIK	282
BCMA	149362 (humano)	QVQLQESGPGLVKPSRTEFLTCVSGGSISSYYMGIROPFGKLEWIGSIYYSGSAYY NPSLKSRTISVDTSKQFSLRLSVAADAVYCARHWQEWPDADFIWGGQTMVTVSSG GGSGGGSGGGSETLITQSPAFMSATPGDKVILISCKASQDIDDANWYQOKPGEAPLFI IQATSVPVPGIPRFRSGSGGTFDFTLITINNIESEDAAYYFCIQHDNPFLLTFGGGKLEIK	283
BCMA	149363 (humano)	VNLRSGPALVKPTQTITLITCTPSGFSRLTSGMCSWIRQPPGKALEWLARIDWDEDKFTYS TSLKTRITISKDTSDNQVLRMTNMDPADTATYCARSGAGGTSAATAPDIWGGQTMVTVSS GGSGGGSGGGSDIQMTQSPSLASVGDRTITCRASQDIYNNLAWFQKPGSAPRS LMYAANKSQSGVPSRFRSGSAGTDTLITISSLQPEDFATYICQHYRFPYSPGQGTKLEIK	284
BCMA	149364 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTESYSMNWVRRQAPGKLEWVSSISSSSSIYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAKTIAAVYAFDIWGGQTMVTVSSGGG GSGGGSGGGSEIVLTQSPSLPVTPEEPASISCRSSQSLHNSGNYLDWYLQKPGOSP QLLLIYLGSNRAAGVDRFSGSGGSDFTLITISRLPEDEFAVYCYQYQYELPLTFGGGKLE IK	285
BCMA	149365 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTESDYMSWIRQAPGKLEWVSISSSGSTIYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARDLRGAFDIWGGQTMVTVSSGGGGS GGGGGGGGSSVLTQSPSVSAAPGYTATISCGGNNIGTKSVHWYQOKPGQAPLILVIRDS VRPSKIPIRFRSGSNMNTLITISGVQAGDEADFYCQVWDSDEHVVFVGGGKLTIVL	286

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
BCMA	149366 (humano)	QVQLVQSGAEYKPKGASVKVSKPSGYT VT SHYIHWRRAPGQGLEWMGMINPESGGTAYS QTLQGRVTMTSDTSSSTVYMELSSLRSEDTAMYCARGGSGWYFDWGRGTLVTVSSGG GGSGGGGGSSSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDGLSKKYVSWYQQKAGQSPVLLIS RDKRPSGIPDRFSGNSADTALTI SGTQ AMDEADYYCQAWDDT TVV FGGGTKLTVL	287
BCMA	149367 (humano)	QVQLQESGGPLVKPQSLTCTVSGGSISSGGYXWMIROHPGKLEWIGYIYYSGSTYY NPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARAGIAARLRGAFDIWGGTMTVTVS SGGGSGGGGGSDIVMTQSPSVSASVGD RV ITCRASQGI RNL AWYQQKPKGKAPN LLIYAAASNLQSGVPSRFSGSGSGADFTTITISLQPEDVATYYCQKNSAFPTFGFGTKVDI K	288
BCMA	149368 (humano)	QVQLVQSGAEYKPKGSSVKVSKCASGGTFS SY AI SWV QAPGQGLEWMGGIIP IF FGTANYA QKFGGRVTITADESTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYQLLRWDVGLLRSAFADIWGG TMVTVSSGGGGGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPK GQAPVLVLYGKNNRPSVDPDRFSGRSGTASLTIITGAQAEDADYYC SR DRDSSGGHLRVF GTGT KV TVL	289
BCMA	149369 (humano)	EVQLQQSGPGLVKPQSLTCAISGDSVSSNSAAMNWI RQ SPSRGLEWLGRTYYR SR KWYS FYAISLKSRIIINPDTSKNQFSLQKSVTPEDTAVYYCARSPPEGLFLYEDPWGGTIVT VSSGGGGGGGGSSSELTQDPAVSV AL QTI RI TCQSDSLGNYATWYQQKPKGQAP VLVIYGTNNRPSGIPDRFSSASSGNTASLTIITGAQAEDADYYC NS DRDSSGGHLLFGTGTK VTVL	290
BCMA	EBB-C1978-A4 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SY AMSWVROAPGKGLEWYSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDN SK NLYLQMNLSLRADDTAVYYCAKVEGSSGLDYWGQGTIVTVSSGGGG SGGGSGGGSEIVMTQSPGTLSLSPGERATLS CR ASQSVSA Y AWYQQKPKGQPPRLLIS GASTRATGIPDRFSGSGGTDFLTI SR LEPEDFAVYYCQHYGSSFN GS SLTFPGQTRLE IK	291
BCMA	EBB-C1978-G1 (humano)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGHSRYPMSW VR QAPGKGLEWYSGISDSG YSTIYADSAKGRFTISRDN SK NILFLQMSLRDEDTAVYYCVTRAGSEASDIWGG GIMVTVSSGGGGGGGGSEIVL TQ SPATLSLSPGERATLS SCR ASQSV SN SL AWYQQKPKGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTI SR LEPEDFAIYYCQQ FGTSSGLTFGGGKLEIK	292
BCMA	EBB-C1979-C1 (humano)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SY AMSWVROAPGKGLEWYSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNLSLRADDTAIYYCARATYKRELRY Y GMDVWGGTMTVTV SSGGGGGGGGGGSEIVMTQSPGTLSLSPGERATLS SCR ASQSV SN SLAWYQQKPKGQA PRLLIYGAS SR ATGIPDRFSGSGGTDFLTI SR LEPEDSAVYYCQHYHSS SP SWTFGGQTR LEIK	293

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
BCMA	EBB-1978-C7 (humano)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNILKAEDTAVYYCARATYKRELRYYYGMDVWGQGTIVIV SSGGSGGGGGSEIVLTQSPGSLSPGESATLSCRASQSVSTFLAWYQQKPGQAA PRLLIYGSSNRATGIPDRFSGSGGTDFTLTIIRLEPEDFAVYYCQQHYESSPSWTFGGQTK VEIK	294
BCMA	EBB-1978-D10	EVQLVETGGGLVQPRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISMNSSGSIQGYA	295
BCMA	EBB-1979-C12 (humano)	DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNILRDEDTAVYYCARVYKAVPDVWGQGTIVTVSSGGGG GGGGGGGGDIIVMTQPSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA .SSLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTTFYSIFGGQTRLEIK	296
BCMA	EBB-1980-G4 (humano)	EVQLVESGGGLVQPRSLRLSCTASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAINWKNGLSLAYG DSVKGRFAISRDNKNTVFLQMNILRDEDTAVYYCASHQGVAYYNVYAMDVWGRGTLIVTVSS GGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRATQSISSFLAWYQQRPGQAPR LLIYGASQRATGIPDRFSGSGGTDFTLTIIRLEPEDSAVYYCQHYESSPSWTFGGQTKVE IK	297
BCMA	EBB-1980-D2 (humano)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFESSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNILRAEDTAVYYCAKAVYRDGMDVWG QGTIVTVSSGGGGGGGGSEIVLTQSPA TLSPGERATLSCRASQSVSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYGASRATGIPDRFSGSGGTDFLTIIRLEPEDFAVYYCQ QYGGPPRFIFGPGTKVDIK	298
BCMA	EBB-1978-A10 (humano)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFESSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG GSTYYADSVKGRFTMSRENDKNSVFLQMNILRVEDTGVVYCARANYKRELRYYY GMDVWGQGTIVTVSSGGGGGGGGGGSEIVMTQSPGILSLSPGESATLSCR ASORVANSYLAWYQHKPGQAPSLISGASRATGVPDRFSGSGGTDFLTIIRLEPED EDSAVYYCQHYDSSPSWTFGGQTKVEIK	299
BCMA	EBB-1978-D4	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNILRAEDTAVYYCAKALVGTAFDIWGQGTIVTVSSGG GGGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLSNFLAWYQQKPGQAPGLL IYGASNWATGTPDRFSGSGGTDFTLTIIRLEPEDFAVYYCQYYGTSEMYTFFGGQTKVEIK	300

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD33	141644 (humano)	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYIFTNYVHVRQAPGQGLEWMMGII ¹ SPSGGSP ² TYA QRLQGRVTMT ³ RDLS ⁴ TSVYMEI ⁵ SL ⁶ TS ⁷ EDTAVYFCARESR ⁸ LRGNRLGLQ ⁹ SSIFDHWGQ ¹⁰ GL VTVSSASGGGGGGGGSDIRMTQSP ¹¹ SLASVGDRTVITPCQASQDINNHLN ¹² WYQOK PGKAPQLLI ¹³ YDTSNLEIGVPSRFSGGSGTDFLT ¹⁴ TISSLQPEDIA ¹⁵ TYCQQYENL ¹⁶ PLTFGG GTKVEIK	307
CD33	141645 (humano)	QVQLVQSGGGLVQPGGSLR ¹ LSCAASGFT ² ESSYAMSV ³ WRQAPGKLEWVSAISGSGG ⁴ STYYA DSVKGRFTI ⁵ SRD ⁶ NSKNTLYLQ ⁷ MNSLRAEDTAVYCAKEDTIRGPNYY ⁸ YGM ⁹ DVWGQ ¹⁰ GTVT VSSASGGGGGGGGSEETITQSP ¹¹ SSVSAVGDRTVITCRASQDID ¹² TWLAWYQLKPG KAPKLLMYAASNLOGGVPSRFSGGSGTDFLT ¹³ TISSLQPEDFATYYCQ ¹⁴ QASIFFP ¹⁵ TFGGGT KVDIK	308
CD33	141646 (humano)	QVQLVQSGAEVKKPESLKI ¹ SCKGGYSF ² TSYI ³ GWVROMPGKLEWMMGII ⁴ YPGDS ⁵ DT ⁶ RY ⁷ PSFQGV ⁸ TI ⁹ SADKSI ¹⁰ TTAYLQ ¹¹ MNSLRASDSAMYCARGGY ¹² DYDF ¹³ FWGQ ¹⁴ GL ¹⁵ VT ¹⁶ VSSA SGGGSGGGGGSEIVMTQSP ¹⁷ SLPVPGEPA ¹⁸ ISCRSSQLLHNSGYN ¹⁹ LDWYLQ ²⁰ KP GQSPQLLI ²¹ YLGSNRASGVDRFSGSGGTDFLT ²² LKISRVEAEDVGVY ²³ YCMQALQ ²⁴ TF ²⁵ TFGGG TKVEIK	309
CD33	141647 (humano)	QVQLVQSGGDLAQPGRSLR ¹ LSCAASGFT ² EDDYAMH ³ WVRQAPGKLEWVAVI ⁴ WRDGGQ ⁵ KY ⁶ YG DSVKGRFTVSRD ⁷ NPKNLYLQ ⁸ MNSLRAEDTAVYCV ⁹ RHF ¹⁰ ENAWD ¹¹ WYGGT ¹² LV ¹³ VSSASGGGG SGGGSGGGSDIQ ¹⁴ LTQSP ¹⁵ SLSAYVGRVIT ¹⁶ COASQIG ¹⁷ FLNWFQOK ¹⁸ PKAPKLLI ¹⁹ SD ASNLEP ²⁰ GVPSRFSGGSGTDFLT ²¹ ITNLQ ²² PE ²³ DIATYYCQQY ²⁴ DD ²⁵ LD ²⁶ PLTFGGGT ²⁷ KVEIK	310
CD33	141648 (humano)	QVQLVQSGGGVQPGKSLR ¹ LSCAASGFT ² FSIFAMH ³ WVRQAPGKLEWVATISYDGSNA ⁴ FYA DSVEGRFTI ⁵ SRD ⁶ NSKDSLYLQ ⁷ MDSLRPEDTAVYCVKAGDGY ⁸ DV ⁹ DSWGQ ¹⁰ GL ¹¹ VT ¹² VSSAS GGGGSGGGGGSEIVMTQSP ¹³ SLPVPGEPA ¹⁴ ISCRSSQLLHNSGYN ¹⁵ LDWYLQ ¹⁶ KPG QSPQLLI ¹⁷ YLGSNRASGVDRFSGSGGTDFLT ¹⁸ LKISRVEAEDVGVY ¹⁹ YCMQALQ ²⁰ TF ²¹ FGPGTK VDIK	311
CD33	141649 (humano)	EVQLVDSGGGLVQPGGSLR ¹ LSCAASGFT ² ESSYAMSV ³ WRQAPGKLEWVSAISGSGG ⁴ STYYA DSVKGRFTI ⁵ SRD ⁶ NSKNTLYLQ ⁷ MNSLRAEDTAVYCAKEDT ⁸ YGS ⁹ GT ¹⁰ FDY ¹¹ WGQ ¹² GL ¹³ VT ¹⁴ VSSA SGGGSGGGGGSDIQ ¹⁵ MTQSP ¹⁶ SLASVGDRTVITSCRASQIGI ¹⁷ YLA ¹⁸ WYQ ¹⁹ RS ²⁰ GK ²¹ PFQ LLIHGASTLQSGVPSRFSGGSGTDFLT ²² ITISLQPEDFAS ²³ YWCQQ ²⁴ SNN ²⁵ FP ²⁶ P ²⁷ TFGGGT ²⁸ KVEI K	312
CD33	141650 (humano)	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYM ¹ FTDFI ² HWRQAPGQGLEWMMGN ³ PN ⁴ SGVT ⁵ KYA QK ⁶ FQGRVTMT ⁷ RDLS ⁸ IS ⁹ TAYMEI ¹⁰ SL ¹¹ RS ¹² EDTAVYCATW ¹³ SSGWY ¹⁴ GI ¹⁵ ANL ¹⁶ WGQ ¹⁷ GL ¹⁸ VT ¹⁹ VSSA SGGGSGGGGGSDIQ ²⁰ LTQSP ²¹ SLASVGDRTVIT ²² COASHDI ²³ SN ²⁴ Y ²⁵ LH ²⁶ WY ²⁷ QOK ²⁸ PKAPK LLI ²⁹ YDASNLE ³⁰ TGVPSRFTGGSGGTDFLT ³¹ ITRS ³² LQ ³³ PE ³⁴ DAV ³⁵ Y ³⁶ CQQ ³⁷ SDD ³⁸ LD ³⁹ PL ⁴⁰ TFGGGT ⁴¹ KVDI K	313

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD33	141651 (humano)	QVQLVQSGAEVKKPESLIKI SCKGSGYS FTNYWI GWVRQMP GKLEWMI IYPGSDTRYS PSFQGVTI SADKSI STAYLQWSS LKASDTAMYYCARHGFSWGEFDYWGQGLVTVSSAS GGGGGGGGSDIRLITQSPSSLSASVGRVITITCRASOSI SSYLNWYQOKFKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGGSDTDFLTITSSLOPEDPATYYCQSYSTPLTFGGGTKVDIK	314
CD33	2213 (humano zado)	NIMLTQSPSSLAIVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSSQKNYLAWYQQIPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGGDTFTLT ISSVQSEDLAIYCHQYLSRRTFFGGGPKLE IKRGGGGGGGGGGGQVQLQQP GAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWI KQTPGQGLEWVGIYPGNDDISYNQKFKGKATLTADKSSITAYNQLSLSLTSEDSA VYYCAREVRLRYFDVWGGTIVTVSS	315
CD33	My96 (humano zado)	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIY WASTRESGVPDRFTGSGGDTFTLT ISSVQPEDLAIYCHQYLSRRTFFGGGPKLE IKRGGGGGGGGGGGQVQLQQP GAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWI KQTPGQGLEWVGIYPGNDDISYNQKFKGKATLTADKSSITAYNQLSLSLTSEDSA VYYCAREVRLRYFDVWGGTIVTVSS	316
Claudin6	muMAB 64A	EVQLQQSGPELVKRFASMKISCKASGYSFTGYTMWVKQSHGKNLEWIGLINPYN GGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARDYGFVLDYWQGG TTLTVSSGGGGGGGGGGGQIVLTQSPIMSVSPGKVTITCSASS VSYMEHWFQQKPGTSPKLCIYSTINLASGVPARFSGSGGTYSYSLTISRVAEEDAA TYYCQQRSNYPPTFGGGTKLEIK	317
Claudin6	mAb206-LCC	EVQLQQSGPELVKRFASMKISCKASGYSFTGYTMWVKQSHGKNLEWIGLINPYN GGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARDYGFVLDYWQGG TTLTVSSGGGGGGGGGGGQIVLTQSPAIMSAPGKVTITCSASS VSYLHWFQQKPGTSPKLVYSTINLPSGVPARFSGSGGTYSYSLTISRVAEEDAA TYYCQQRSIYPPPTFGGGTKLEIK	318
Claudin6	mAb206-SUBG	EVQLQQSGPELVKRFASMKISCKASGYSFTGYTMWVKQSHGKNLEWIGLINPYN	319
WT1	ESK-1	GGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARDYGFVLDYWQGG TTLTVSSGGGGGGGGGGGQIVLTQSPIMSVSPGKVTITCSASS VSYMEHWFQQKPGTSPKLCIYSTINLASGVPARFSGSGGTYSYSLTISRVAEEDAA TYYCQQRSNYPPTFGGGTKLEIK QAVWTQPPSA SCITPGQRVTI SCGSSSSNIG SNTVNWYQQV PGTAPKLLIY SNNQRESGVPDRFSGKSGT SASLAISGLQ SEDEADYYCA AWDDSDINGWV FGGGKLTVL GSRGGGGGG GSGGGGGSLE MAQMQLVQSG AEVKEPGESL RISCKGSGYS FTNFWISWR QMPFGKLEWM	320

(continuación)

Antígeno diana	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
WT1	WT1-2	QIVVTQPPSA SGTPEQRVTI SCSCSSSNIG SNVYVYQQL PGIAPKLLIYRSNQRPSGVP DRFSGSKSGT SASLAISGPR SVDEADYYCA AWDDSLNGW FGGTKLIVL GSRGGGGGG GSGGGGLEM AQQLVQSGA EVKPKGSSVK VSCKASGGTF SSYAISWVRQ APGQGLEMMG GIIFIFGTAN YAQKFGQRTV ITADESTSTA YMESSLRSE DTAVYICARR IPPYYGMDVM GQGTIVTVSS	321
WT1	WT1-3	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQIS SYLNWYQOKP GKAPKLLIYA ASSLQGVPS RFGSGSGTD FTLLISLQP EDFATYYCQQ SYSTPLTFGG GTVYDIKRSR GGGGGGGGS GGGGLEMAQ VQLQQSGFGL VKPSQTLSLI CAISGDSVSS NSAAWNWIRQ SPSRGLWLG RTIYGSKWYN DYAVSVKRSRI TINPDTSKNQ FSLQLNSVTP EDTAVYICAR GRLGDAFDIW GQGTIVTVSS	322
WT1	WT1-4	DIQMTQSEPT LSASVGDRTV ITCRASQIN KWLAWYQORP GKAPQLLIYK ASSLESGVPS RFGSGSGTE YTLTISLQP DDFATYYCQQ YNSYATFGQG TKVEIKRSR GGGGGGGGG GGGLEMAQV QLVQSGAEVK KPGESLKISC KSGYFNK WIGWVRLPG RLEWIAIIV PYSDIITYSP SFQGRVTISA DTSINIYALH WHSLKASDTA MYICVRHTAL AGFDYWGLGT LVTVSS	323
WT1	WT1-5	QSVVTQPPSV SVAPGKTARI TCGRNIGSK SVHWYQOKPG QAPVLVYDD SDRPSGPER FSGNSGNTA TLTIISRVEAG DEADYYCQW DSSSDHVFEG GKTKLIVLGS RGGGGGGGG SGGLEMAEV QLVQSGGGW RFGSLRLSC AASGFTFDDY GMSWVRQAPG KGLEWVSGIN WNGGSGTGYAD SVRGRETIISR DNAKNSLYLQ MNSLRAEDTA LYICARERGY GYHDPHDYWG QGTLVTVSS	324
WT1	WT1-6	QSVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGSSSNIG AGYDVHWYQQ LPGAAPKLLI YGNRNREGV PDRFSGSKSG TSASLAISGL QSEDEADYYC AAWDDSLNGY VFGTGTKLTV LGSRCGGGGG GGGGGGGSL ENAEVQLVET GGLLQPGGS LRLSCAASGF SVSYTYMGWV RQAPKGLEW VALLYSGGT YHPASLQGRF IVSRDSSKNM VYLQNSLKA EDTAVYICAK GGAGGGHEDS WGQTLVTVS S	325
WT1	WT1-7	EVQLLEGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKLEWVSQ IDFWGQETLY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMNLSLRAED TAVYICAKLT GRFDYWGQGT LVTVSSGGGG SGGGGGGGG STDIQMTQSP SLSASVGDV VITICRASQS ISSYLNWYQQ KPGAPKLLI YSASQLQSGV PRFSGSGG TDFTLTISL QPDEFATYYC QQGFGTPNTF GQGTKEIKR A	326

- Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno contra mesotelina es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un dominio de unión a anti-mesotelina descrito en la Tabla 4, por ejemplo ss1, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, 10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M19, M20, M21, M22, M23 o M24, por ejemplo, ss1, M5 o M11. Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno
- 5 contra mesotelina es una porción de unión a antígeno humano, por ejemplo, CDRs, de un dominio de unión a anti-mesotelina humano descrito en la Tabla 4, por ejemplo M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, 10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M19, M20, M21, M22, M23, o M24, por ejemplo, M5 o M11. Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno que se une a la mesotelina es un dominio de unión a antígeno según las Tablas 2-3 del WO 2015/090230.
- 10 Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno humano que se une a la mesotelina se une al mismo epítipo que el epítipo unido por el dominio de unión a antígeno murino SS1 (proporcionado en la Tabla 4). Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno humano que se une a la mesotelina se une a un epítipo diferente al epítipo unido por el dominio de unión a antígeno murino SS1 (proporcionado en la Tabla 4). Como se describe en WO 2015/090230, los dominios de unión a la anti-mesotelina humana M-5 y M-11
- 15 descritos en la Tabla 4 se unen a un epítipo diferente al del SS1.
- Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno contra CLL-1 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo disponible en R&D, ebiosciences, Abcam, por ejemplo, PE-CLL1-hu Cat# 353604 (BioLegend); y PE-CLL1 (CLEC12A) Cat# 562566 (BD). Opcionalmente, una porción de unión a antígeno
- 20 contra CLL-1 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un dominio de unión a anti-CLL-1 descrito en la Tabla 4, por ejemplo, 139115, 139116, 139117, 139118, 139119, 139120, 139121, 139121, 139122, 146259, 146261, 146262, 146263, 146264 o 181286.
- 25 Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno contra CD123 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un dominio de unión anti-CD123 descrito en la Tabla 4, por ejemplo, CD123-1, CD123-2, CD123-3, CD123-4, o hzCAR1-32. Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno
- 30 contra CD123 es un dominio de unión a antígeno según las Tablas 1-2 del WO 2014/130635.
- Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno contra CD33 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Bross et al., Clin Cancer Res 7(6): 1490-1496 (2001) (Gemtuzumab Ozogamicin, hP67.6), Caron et al., Cancer Res 52(24):6761-6767 (1992) (Lintuzumab, HuM195), Lapusan et al., Invest New Drugs 30(3):1121-1131 (2012) (AVE9633), Aigner et al., Leukemia 27(5): 1107-1115 (2013) (AMG330, CD33 BiTE), Dutour et al., Adv hematol 2012:683065 (2012), y Pizzitola et al., Leukemia doi:10.1038/Lue.2014.62 (2014). Como se describe en el presente documento, una porción de unión a antígeno
- 35 contra CD33 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un dominio de unión anti-CD33 descrito en la Tabla 4, por ejemplo, 141643, 141644, 141645, 141646, 141647, 141648, 141649, 141650, 141651, 2213 o My96.
- 40 Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno contra GD2 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Mujoo et al., Cancer Res. 47(4):1098-1104 (1987) Cheung et al., Cancer Res 45(6):2642-2649 (1985), Cheung et al., J Clin Oncol 5(9):1430-1440 (1987), Cheung et al., J Clin Oncol 16(9):3053-3060 (1998), Handgretinger et al., Cancer Immunol Immunother 35(3):199-204 (1992). Opcionalmente, un dominio de unión a antígeno contra GD2 es una porción de unión a antígeno de un anticuerpo
- 45 seleccionado entre mAb 14.18, 14G2a, ch14.18, hu14.18, 3F8, hu3F8, 3G6, 8B6, 60C3, 10B8, ME36.1 y 8H9, véase, por ejemplo, WO2012033885, WO2013040371, WO2013192294, WO2013061273, WO2013123061, WO2013074916y WO201385552. Opcionalmente, un dominio de unión a antígeno contra GD2 es una porción de unión a antígeno de un anticuerpo descrito en Publicación de EE.UU. No: 20100150910 o WO 2011160119.
- 50 Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno contra BCMA es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, WO2012163805, WO200112812 y WO2003062401. Como se describe en el presente documento, una porción de unión a antígeno contra bcma es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un dominio de unión anti-bcma descrito en la Tabla 4, por ejemplo 139100, 139101, 139102, 139103, 139104, 139105, 139106, 139107, 139108, 139109, 139110, 139111, 139112, 139113, 139114, 149362, 149363, 149364, 149365, 149366, 149367, 149368, 149369, EB c1978-A4, EB C1978-G1, EBB C1978-C7, EBB C1978-D10, EBB C1978-A10, EBB C1978-D4, EBB C1978-G4, EBB C1979-C1, EBB C1979-C12, EBB C1980-G4, EBB C1980-D2, EBB C1980-A2, EBB C1981- C3, huscFvBCMA1, o huscFvBCMA2.
- 55 Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno contra WT-1 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Dao et al., Sci Transl Med 5(176):176ra33 (2013); o WO2012/135854. Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno contra WT1 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un dominio de unión anti-WT1 descrito en la Tabla 4, por ejemplo, ESK1, WT1-2, WT1-3, WT1-4, WT1-5, WT1-6 o WT1-7.
- 60 Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno contra CLDN6 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo IMAB027 (Ganymed Pharmaceuticals), véase, por ejemplo, clinicaltrial.gov/show/NCT02054351. Opcionalmente, un dominio de unión a antígeno contra CLDN6 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un dominio de unión anti-CLDN6 descrito en la Tabla 4, por ejemplo, muMAB64A, mAb206-LCC o mAb206-SUBG.

Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno comprende una, dos tres (por ejemplo, las tres) CDR de cadena pesada, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente, y/o una, dos, tres (por ejemplo, las tres) CDR de cadena ligera, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente. Opcionalmente, el dominio de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo de los mencionados anteriormente.

Andamios sin anticuerpos

Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno comprende un andamio sin anticuerpo, por ejemplo, una fibronectina, una anquirina, un anticuerpo de dominio, una lipocalina, un pequeño inmunofármaco modular, un maxicuerpo, una proteína A o una aflina. El andamio sin anticuerpos tiene la capacidad de unirse al antígeno diana en una célula. Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno es un polipéptido o un fragmento del mismo de una proteína natural expresada en una célula. Opcionalmente, el dominio de unión al antígeno comprende un andamio sin anticuerpos. Se puede emplear una amplia variedad de andamios sin anticuerpos siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente al antígeno diana en una célula diana.

Los andamios sin anticuerpos incluyen: fibronectina (Novartis, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA, y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), pequeños inmunofármacos modulares (Trubion Pharmaceuticals Inc, Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), proteína A (Afficuerpo AG, Suecia) y aflina (gammacristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

Los andamios de fibronectina pueden basarse en el dominio de fibronectina tipo III (por ejemplo, el décimo módulo de la fibronectina tipo III(dominio10 Fn3)). El dominio de la fibronectina tipo III tiene 7 u 8 hebras beta que se distribuyen entre dos hojas beta, que a su vez se empaquetan entre sí para formar el núcleo de la proteína, y que además contienen bucles (análogos a las CDR) que conectan las hebras beta entre sí y están expuestas al disolvente. Hay al menos tres de estos bucles en cada borde del sándwich de hojas beta, donde el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las hebras beta (véase US 6,818,418). Debido a esta estructura, este andamio sin anticuerpos imita las propiedades de unión al antígeno que son similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos andamios pueden utilizarse en una estrategia de aleatorización y barajado de bucles *in vitro* que es similar al proceso de maduración por afinidad de los anticuerpos *in vivo*.

La tecnología de la anquirina se basa en el uso de proteínas con módulos de repetición derivados de la anquirina como andamios para portar regiones variables que pueden usarse para unirse a diferentes objetivos. El módulo de repetición de anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consta de dos hélices α antiparalelas y un giro β . La unión de las regiones variables se optimiza en la mayoría de los casos mediante la visualización de ribosomas.

Los avímeros se derivan de la proteína natural que contiene el dominio A, como la HER3. Estos dominios son utilizados por la naturaleza para las interacciones proteína-proteína y en el ser humano más de 250 proteínas se basan estructuralmente en los dominios A. Los avímeros están formados por una serie de monómeros de "dominio A" diferentes (2-10) unidos mediante enlazadores de aminoácidos. Pueden crearse avímeros que se unan al antígeno diana utilizando la metodología descrita, por ejemplo, en La publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 20040175756 20050053973 20050048512y 20060008844.

Los ligandos de afinidad Afficuerpo son proteínas pequeñas y sencillas compuestas por un haz de tres hélices basado en el andamio de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A. La proteína A es una proteína de superficie de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio de andamio consta de 58 aminoácidos, 13 de los cuales están aleatorizados para generar bibliotecas de aficuerpos con un gran número de variantes de ligandos (Véase, por ejemplo, el documento US 5,831,012). Las moléculas de aficuerpos imitan a los anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de las moléculas aficuerpos es similar al de un anticuerpo.

Los miméticos de epítopos proteicos (PEM) son moléculas cíclicas de tamaño medio, similares a los péptidos (MW 1-2kDa), que imitan las estructuras secundarias de las proteínas en forma de beta-horquilla, la principal estructura secundaria implicada en las interacciones proteína-proteína

DOMINIOS DE UNIÓN A ANTÍGENOS NO COINCIDENTES

Se ha descubierto, que las células que tienen una pluralidad de receptores quiméricos embebidos en la membrana, cada uno de los cuales comprende un dominio de unión a antígeno (CMER), que las interacciones entre el dominio de unión a antígeno del CMER pueden ser indeseables, por ejemplo, porque inhibe la capacidad de uno o más de los dominios de unión a antígeno para unirse a su antígeno cognado. En consecuencia, se divulgan en el presente documento un primer y un segundo CMER de origen no natural que comprenden dominios de unión a antígenos que minimizan dichas interacciones cuando se expresan en la misma célula. Como se describe en el presente documento, una pluralidad de CMERs comprende dos TCARs. Opcionalmente, una pluralidad de CMERs comprende un TCAR y otro CMER. Opcionalmente, una pluralidad de CMERs comprende dos NKR-CARs. Opcionalmente, una pluralidad de

CMERs comprende un NKR-CAR y otro CMER. Opcionalmente, una pluralidad de CMERs comprende un TCAR y un NKR-CAR.

5 Como se describe en el presente documento, la divulgación comprende un primer y un segundo CMER, en el que el dominio de unión a antígeno de uno de dicho primer CMER dicho segundo CMER no comprende un dominio ligero variable y un dominio pesado variable. Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros CMER dichos segundos CMER es un scFv, y el otro no es un scFv. Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno de uno de dicho primer CMER dicho segundo CMER comprende un dominio VH único, por ejemplo, un dominio VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio VH único derivado de una secuencia humana o de ratón o de un andamio no anticuerpo. Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros CMER dicho segundo CMER comprende un nanocuerpo. Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros CMER dicho segundo CMER comprende un dominio VHH de camélido.

10 Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros CMER y segundos CMER comprende un scFv, y el otro comprende un dominio VH único, por ejemplo, un dominio VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio VH único derivado de una secuencia humana o de ratón. Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros CMER y de los segundos comprende un scFv, y el otro comprende un nanocuerpo. Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros CMER comprende un scFv, y el otro comprende un dominio VHH de camélido.

15 Como se describe en el presente documento, cuando está presente en la superficie de una célula, la unión del dominio de unión a antígeno de dicho primer CMER a su antígeno afín no se reduce sustancialmente por la presencia de dicho segundo CMER. Como se describe en el presente documento, la unión del dominio de unión a antígeno de dicho primer CMER a su antígeno afín en presencia de dicho segundo CMER es del 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la unión del dominio de unión a antígeno de dicho primer CMER a su antígeno afín en ausencia de dicho segundo CMER.

20 Como se describe en el presente documento, cuando están presentes en la superficie de una célula, los dominios de unión a antígeno de dicho primer CMER dicho segundo CMER, se asocian entre sí menos que si ambos fueran dominios de unión a antígeno scFv. Como se describe en el presente documento, los dominios de unión a antígeno de dicho primer CMER dicho segundo CMER, se asocian entre sí un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % menos que si ambos fueran dominios de unión a antígeno scFv.

25 La divulgación describe un primer y segundo KIR-CAR, en el que el dominio de unión a antígeno de uno de dicho primer KIR-CAR dicho segundo KIR-CAR no comprende un dominio ligero variable y un dominio pesado variable. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros KIR-CAR y de los segundos KIR-CAR es un scFv, y el otro no es un scFv. Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros KIR-CAR y de dichos segundos KIR-CAR comprende un dominio VH único, por ejemplo, un dominio VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio VH único derivado de una secuencia humana o de ratón o de un andamio sin anticuerpos. Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros KIR-CAR y de dichos segundos KIR-CAR comprende un nanocuerpo. Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros KIR-CAR y de dichos segundos KIR-CAR comprende un dominio VHH de camélido.

30 Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros KIR-CAR y segundos KIR-CAR comprende un scFv, y el otro comprende un dominio VH único, por ejemplo, un dominio VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio VH único derivado de una secuencia humana o de ratón. Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros KIR-CAR y segundos KIR-CAR comprende un scFv, y el otro comprende un nanocuerpo. Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros KIR-CAR y segundos KIR-CAR comprende un scFv, y el otro comprende un dominio VHH de camélido.

35 Como se describe en el presente documento, cuando está presente en la superficie de una célula, la unión del dominio de unión a antígeno de dicho primer KIR-CAR a su antígeno afín no se reduce sustancialmente por la presencia de dicho segundo KIR-CAR. Como se describe en el presente documento, la unión del dominio de unión a antígeno de dicho primer KIR-CAR a su antígeno afín en presencia de dicho segundo KIR-CAR es del 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la unión del dominio de unión a antígeno de dicho primer KIR-CAR a su antígeno afín en ausencia de dicho segundo KIR-CAR.

40 Como se describe en el presente documento, cuando están presentes en la superficie de una célula, los dominios de unión a antígeno de dicho primer KIR-CAR dicho segundo KIR-CAR, se asocian entre sí menos que si ambos fueran dominios de unión a antígeno scFv. Como se describe en el presente documento, los dominios de unión a antígeno de dicho primer KIR-CAR dicho segundo KIR-CAR, se asocian entre sí un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % menos que si ambos fueran dominios de unión a antígeno scFv.

45 La divulgación describe un primer y segundo TCAR, en el que el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros TCAR dicho segundo TCAR no comprende un dominio ligero variable y un dominio pesado variable. Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros TCAR y segundos

TCAR es un scFv, y el otro no es un scFv. Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros TCAR y de dichos segundos TCAR comprende un dominio VH único, por ejemplo, un dominio VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio VH único derivado de una secuencia humana o de ratón o de un andamio sin anticuerpos. Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros TCAR y de los segundos TCAR comprende un nanocuerpo. Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros TCAR dicho segundo TCAR comprende un dominio VHH de camélido.

Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros TCAR y segundos TCAR comprende un scFv, y el otro comprende un dominio VH único, por ejemplo, un dominio VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio VH único derivado de una secuencia humana o de ratón. Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros TCAR y segundos TCAR comprende un scFv, y el otro comprende un nanocuerpo. Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno de uno de dichos primeros TCAR y segundos TCAR comprende un scFv, y el otro comprende un dominio VHH de camélido.

Como se describe en el presente documento, cuando está presente en la superficie de una célula, la unión del dominio de unión a antígeno de dicho primer TCAR a su antígeno afin no se reduce sustancialmente por la presencia de dicho segundo TCAR. Como se describe en el presente documento, la unión del dominio de unión a antígeno de dicho primer TCAR a su antígeno afin en presencia de dicho segundo TCAR es del 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la unión del dominio de unión a antígeno de dicho primer TCAR a su antígeno afin en ausencia de dicho segundo TCAR.

Como se describe en el presente documento, cuando están presentes en la superficie de una célula, los dominios de unión a antígeno de dicho primer TCAR dicho segundo TCAR, se asocian entre sí menos que si ambos fueran dominios de unión a antígeno scFv. Como se describe en el presente documento, los dominios de unión a antígeno de dicho primer TCAR dicho segundo TCAR, se asocian entre sí un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % menos que si ambos fueran dominios de unión a antígeno scFv.

CARs biespecíficos

Un dominio de unión a antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, para un NKR-CAR o un TCAR descrito en el presente documento, comprende una molécula de anticuerpo multiespecífica, por ejemplo, una molécula de anticuerpo biespecífica. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad para no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. Como se describe en el presente documento, el primer y el segundo epítopos se encuentran en el mismo antígeno, por ejemplo, la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). Como se describe en este documento, el primer y el segundo epítipo se solapan. Como se describe en este documento, el primer y el segundo epítopos no se solapan. Como se describe en el presente documento, el primer y el segundo epítopos se encuentran en antígenos diferentes, por ejemplo, en proteínas diferentes (o en subunidades diferentes de una proteína multimérica). Como se describe en el presente documento, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un primer epítipo y una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un segundo epítipo. Como se describe en el presente documento, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un medio anticuerpo que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y un medio anticuerpo que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. Como se describe en el presente documento, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un medio anticuerpo, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y un medio anticuerpo, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. Como se describe en el presente documento, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un scFv, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y un scFv, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo.

Como se describe en el presente documento, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífica (por ejemplo, una biespecífica o una trispecífica). Los protocolos para generar moléculas de anticuerpos biespecíficos o heterodiméricos son conocidos en la técnica; incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, el enfoque de "botón en hojal" descrito en, por *ejemplo*, US 5731168; el emparejamiento Fc de dirección electrostática descrito en, por *ejemplo* WO 09/089004, WO 06/106905 y WO 2010/129304; formación de heterodímeros de dominios modificados por ingeniería de intercambio de cadenas (SEED) como se describe, por *ejemplo*, en WO 07/110205; intercambio de brazos Fab como se describe, por *ejemplo*, en WO 08/119353, WO 2011/131746, y WO 2013/060867; doble conjugado de anticuerpos, por *ejemplo*, mediante la reticulación de anticuerpos para generar una estructura biespecífica utilizando un reactivo heterobifuncional que tiene un grupo reactivo amina y un grupo reactivo sulfhidrilo como se describe en, por *ejemplo*, US 4433059; determinantes de anticuerpos biespecíficos generados mediante la recombinación de medios anticuerpos (pares de cadenas pesadas y ligeras o Fabs) de diferentes anticuerpos a través del ciclo de reducción y oxidación de los enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas, como se describe en, por *ejemplo*, US 4444878; anticuerpos trifuncionales, por *ejemplo*, tres fragmentos Fab' reticulados a través de grupos reactivos sulfhidrilos, como se describe en, por *ejemplo* US5273743; proteínas de unión biosintética, por *ejemplo*, un par de scFvs reticulados a través de las colas C-terminales, preferentemente mediante reticulación química disulfuro

o amina-reactiva, como se describe en, por *ejemplo* US5534254; anticuerpos bifuncionales, por *ejemplo*, fragmentos Fab con diferentes especificidades de unión dimerizados a través de cremalleras de leucina (por ejemplo, c-fos y c-jun) que han sustituido el dominio constante, como se describe en, por ejemplo, US5582996; receptores mono-específicos y oligoespecíficos, por ejemplo, regiones VH-CH1 de dos anticuerpos (dos fragmentos Fab) unidos a través de un espaciador polipeptídico entre la región CH1 de un anticuerpo y la región VH del otro anticuerpo típicamente con cadenas ligeras asociadas, como se describe en, por ejemplo, US5591828; conjugados biespecíficos de ADN-anticuerpo, por *ejemplo*, reticulación de anticuerpos o fragmentos Fab a través de un trozo de ADN de doble cadena, como se describe en, por ejemplo, US5635602 proteínas de fusión biespecíficas, por ejemplo, una construcción de expresión que contiene dos scFv con un enlazador péptido helicoidal hidrofílico entre ellos y una región constante completa, como se describe en, por ejemplo, US5637481 proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas, por *ejemplo*, dímeros de polipéptidos que tienen un primer dominio con una región de unión de la región variable de la cadena pesada de Ig, y un segundo dominio con una región de unión de la región variable de la cadena ligera de Ig, generalmente denominados diábolos (también se incluyen estructuras de orden superior que crean moléculas biespecíficas, triespecíficas o tetraespecíficas, como se describe en, por *ejemplo*, US5837242; constructos de minicuerpos con cadenas VL y VH enlazadas y conectadas con espaciadores peptídicos a una región bisagra de anticuerpo y a la región CH3, que pueden dimerizarse para formar moléculas biespecíficas/multivalentes, como se describe en, por ejemplo, US5837821; dominios VH y VL unidos con un enlazador peptídico corto (por *ejemplo*, 5 o 10 aminoácidos) o sin enlazador en ninguna orientación, que pueden formar dímeros para formar diacuerpos biespecíficos; trímeros y tetrámeros, como se describe en, por *ejemplo* US5844094; Cadena de dominios VH (o dominios VL en los miembros de la familia) conectados por enlaces peptídicos con grupos reticulables en el C-terminal asociados de nuevo a los dominios VL para formar una serie de FVs (o scFvs), como se describe en, por ejemplo, US5864019; y los polipéptidos de unión de cadena única con un dominio VH y un dominio VL unidos a través de un enlazador peptídico se combinan en estructuras multivalentes a través de enlaces cruzados no covalentes o químicos para formar, por *ejemplo*, estructuras homobivalentes, heterobivalentes, trivalentes y tetravalentes utilizando el formato de tipo scFV o diacuerpo, como se describe en, por ejemplo, US5869620. Otros ejemplos de moléculas multiespecíficas y biespecíficas y de procedimientos para fabricarlas se encuentran, por ejemplo, en US5910573, US5932448, US5959083, US5989830, US6005079, US6239259, US6294353, US6333396, US6476198, US6511663, US6670453, US6743896, US6809185, US6833441, US7129330, US7183076, US7521056, US7527787, US7534866, US7612181, US2002004587A1, US2002076406A1, US2002103345A1, US2003207346A1, US2003211078A1, US2004219643A1, US2004220388A1, US2004242847A1, US2005003403A1, US2005004352A1, US2005069552A1, US2005079170A1, US2005100543A1, US2005136049A1, US2005136051A1, US2005163782A1, US2005266425A1, US2006083747A1, US2006120960A1, US2006204493A1, US2006263367A1, US2007004909A1, US2007087381A1, US2007128150A1, US2007141049A1, US2007154901A1, US2007274985A1, US2008050370A1, US2008069820A1, US2008152645A1, US2008171855A1, US2008241884A1, US2008254512A1, US2008260738A1, US2009130106A1, US2009148905A1, US2009155275A1, US2009162359A1, US2009162360A1, US2009175851A1, US2009175867A1, US2009232811A1, US2009234105A1, US2009263392A1, US2009274649A1, EP346087A2, WO0006605A2, WO02072635A2, WO04081051A1, WO06020258A2, WO2007044887A2, WO2007095338A2, WO2007137760A2, WO2008119353A1, WO2009021754A2, WO2009068630A1, WO9103493A1, WO9323537A1, WO9409131A1, WO9412625A2, WO9509917A1, WO9637621A2, WO9964460A1.

Dentro de cada anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, scFv) de una molécula de anticuerpo biespecífico, el VH puede estar aguas arriba o aguas abajo del VL. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo ascendente (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VH (VH₁) ascendente a su VL (VL₁) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descendente (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VL (VL₂) ascendente a su VH (VH₂), de manera que la molécula de anticuerpo biespecífico global tiene la disposición VH₁-VL₁-VL₂-VH₂. En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo anterior (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VL (VL₁) antes de su VH (VH₁) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo posterior (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VH (VH₂) antes de su VL (VL₂), de manera que la molécula de anticuerpo biespecífico global tiene la disposición VL₁-VH₁-VH₂-VL₂. Opcionalmente, se dispone un enlazador entre los dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFvs), por ejemplo, entre VL₁ y VL₂ si el constructo se dispone como VH₁-VL₁-VL₂-VH₂, o entre VH₁ y VH₂ si el constructo se dispone como VL₁-VH₁-VH₂-VL₂. El enlazador puede ser un enlazador como se describe en el presente documento, por ejemplo, un enlazador (Gly₄-Ser)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferentemente 4 (SEQ ID NO: 63). En general, el enlazador entre los dos scFvs debe ser lo suficientemente largo como para evitar el desajuste entre los dominios de los dos scFvs. Opcionalmente, se dispone un enlazador entre la VL y la VH de la primera scFv. Opcionalmente, se dispone un enlazador entre la VL y la VH de la segunda scFv. En los constructos que tienen múltiples enlazadores, dos o más de los enlazadores pueden ser iguales o diferentes. Como se describe en el presente documento, un CAR biespecífico comprende VLs, VHs, y opcionalmente uno o más enlazadores.

Opcionalmente, la molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina, por ejemplo, un scFv, que tiene especificidad de unión para un antígeno tumoral descrito en el presente documento, por ejemplo, comprende un scFv como se describe en el presente documento, por ejemplo, como se describe en la Tabla 4, o comprende las CDR de cadena ligera y/o las CDR de cadena pesada de un scFv descrito en el presente documento, y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo en un antígeno diferente. Opcionalmente, la segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina tiene especificidad de unión para un antígeno expresado en un tumor, por ejemplo, un antígeno tumoral descrito en el presente documento.

SECUENCIAS CAR EJEMPLARES

El NKR-CAR o TCAR descrito en el presente documento puede comprender una o más secuencias proporcionadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencias de diversos componentes de la CAR (aa - secuencia de aminoácidos, na - secuencia de ácidos nucleicos)

SEQ ID NO	Descrip.	Secuencia
11	Promotor de EF-1 (na)	CGTGAGGCTCCGGTGCCGTCAGTGGGAGAGCGCACATGCCACAGTCCCGAGAA GTTGGGGAGGGTGGCAATTGAACGGGTGCTAGAGAAAGTGGCGGGGTAAA CTGGAAAGTGATGTCGTACTGGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGGAGAACCGT ATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGTTTGCAGCAACAC AGTAAAGTCCGCTGTGGTCCCGCGGGCTGGCCTTTACGGGTTATGGCCCTTGC GTGCTTGAATTAATCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTTGATCCCGAGCTTCGGGT GGAAGTGGTGGAGAGTTCGAGGCCTTGGCTTAAGGAGCCCTTCGCTCGTCTTG AGTTAGGCCTGGCTGGCGCTGGCGCCGCGCGTGGAACTCTGGTGGCACCTTGC GCCTGCTCGCTTCGATAAGTCTAGCCATTAAAAATTTGATGACCTGCTGCGA CGCTTTTTCTGGCAAGATAGTCTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATT CGTTTTTGGCGCGGGGCGAGCGGGCGTGGTCCAGCCACATGTTCCGGC GAGCGGGCTGCGAGCGCGCCACCGAGAATCGACGGGGTAGTCTCAAGCTGG CCGGCTGCTCTGGTGGTGGCTGGCTGGCGCCGCGTATCGCCCGCTGGGGGCAA GGTGGCCCGTGGCACAGTTCGTAAGCGGAAAGATGGCCCTTCCCGCCCTGC TGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGCTCGGGAGAGCGGGGAGTGAGTACC CACAAAAGAAAAGGGCTTCCGCTCAGCCGCTCATGTGACTCCACCGAGT ACCGGGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTCTCGAGCTTTGGAGTACGCTCTTAG GTTGGGGAGGGTTTTATCGGATGGAGTTCCCCACACTGAGTGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTGGCACTTGTAAATCTCTTGGAAATTTGCCCTTTTGGTTTGA TCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGC GTGA
1	Lider (aa)	MALPVTALLPLALLHAARP
12	Lider (na)	ATGGCCCTGCCTGGACAGCCCTGCTGCTGCTCCCTGGCTGCTGCATGCCGCTAGA CCC
2	Bisagra CD 8 (aa)	TTTTAPRRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
13	Bisagra CD8 (na)	ACCACGAGCCAGCGCGGACCAACACACCGGGCCACCATCGCGTCGACGCCCT GTCCTGCGCCAGAGCGTGCAGCCAGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GCTGGACTTCGCCTGTGAT
3	Bisagra de Ig4 (aa)	ESKYGPPPCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLIMISRPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEAGNVEFCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKIM

(continuación)

SEQ ID NO	Descrip.	Secuencia
14	Bisagra Ig4 (na)	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTTGGCCCTGGCCCGGAGTTCCTGGGGGACCC AGCGTGTCTCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAGACACCTGATGATCAGCGGACCCCGA GGTGAAGTGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAGTGG TACGTGGACGGGTGGAGTGCACAAGCCCAAGCAAGCCCGGAGGAGGAGTTC ATAGCACCTACCGGTGGTCCGTGCTGACCGTGTGACCGAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAATACAAGTGAAGTGTCCAACAAGGGCCCTGCCAGCAGCATCGAAGAAACCA TCAGCAAGCCCAAGGGCCAGCTCGGGAGCCCAAGGTGTACACCTGCCCTAGCCAA GAGGAGATGACCAAGAACAGGTGCCCTGACCTGCTGGTGAAGGGCTTACCCAG CGACATCGCGTGGAGTGGAGCAACGGCCAGCCGAGCAACAACCTACAAGACCACC CCCCCTGTGTGGACAGCAGCGCAGCTTCTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAA GAGCGGTGGCAGGAGGGCAAGCTTTAGTCTCGTGGTGCAGGAGGCCCTGCAC AACCACTACCCAGAAAGAGCCTGAGCCTGCTCCCTGGCAAGATG
4	Bisagra de IgD (aa)	RWPSPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATRRNTRGRGEEKKEKEEERETKPE CPSHTQLGVYLLTPAVQDLWRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPVGGVEGLLE RHSNGSQSHRSLTLPRLWNAGTSVTCLNHPSLPPQRLMALREPAQAQPVKLSLNLASS DPPEAASWLLCEVSGFPPNLLMLEDQREVNTSGFAPARPPQPGSTTFWAWSVLRVP APSPQPATYTCVSHEDSRLLNARSLEVSIVTDH
15	Bisagra IgD (na)	AGGTGGCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTCTACTGCACAGCCCCAGGC AGAAAGCAGCTAGCCAAAGTACTACTGCACCTGCCACTACGGCAATACTGGCCGTG GCGGGAGAGAAAGAAAGAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAGAGAGAC CAAGACCCCTGAATGCCATCCCATACCCAGCCGTGGCGTCTACTTGTACTCCCGC AGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTACATGTTTCGTGGGCTCTGA CTGAAGGATGCCCAATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGAAGGTACCCACAGGGGGGTT GAGGAAGGTTGTGGAGGCCAATCCAATGGCTCAGAGCCAGCCTCAAGACTCAC CCTCCGAGATCCCTGTGGACGGCCACTGTGCATGTACTCTAAATCATCTAG CCTGCCCCACAGGCTGTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCCGCCAGCCAGTTAAGC TTAGCCTGAATCTGCTGCCAGTAGTATCCCCAGAGGCCCGCAGCTGGCTTATGCG AAGTCCGGCTTTAGCCGCCCAACATCTGCTCATGTGGCTGGAGACCAGCCGAGAA GTAAACACCAGCGGCTTCCCTCCAGCCGGCCCAAGCCAGCCCGGTTCTACCAATC TGGCCCTGGAGTCTTAAGGGTCCAGCACCCTAGCCCGCCAGCCAGCCACATACAC CTGTGTGTCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGG TTTCTACGTGACTGACCAT
6	Transmembrana CD8 (aa)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
17	Transmembrana CD8 (na)	ATCTACATCTGGCGCCCTTGGCCGGGACTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATC ACCTTTACTGC
7	Dominio intracelular 4-1BB (aa)	KRGRKLLYIFKQFMRPVQTTQEEEDGCSRFEEEEEGGCEL
18	Dominio intracelular 4-1BB (na)	AAACGGGCGAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCACTTTATGAGACCAGTACA AACTACTCAAGGAGAAAGATGGCTGTAGTCCGATTTCCAGAAGAAAGAAAGGAGGA TGTGAACTG

(continuación)

SEQ ID NO	Descrip.	Secuencia
8	CD27 (aa)	QRRKYRSNKGESVPEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQIEDYRKPEPACSP
19	CD27 (na)	AGGAGTAAGAGGAGGAGGCTCTGACACAGTGACTACATGAACATGACTCCCGCGGCC CGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCACCACCGGACTTCGCAGCCTATCG CTCC
9	CD3-zeta (aa) (mutante Q/K)	RVKFSRSDAPAYKQGNQLYNELNLRREEYDVLKRRRDRPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQDKMVAEYSEIGMKERRRGKHDGLYQGLSTATKDYDALHMQLPPR
20	CD3-zeta (na) (mutante Q/K)	AGAGTGAAGTTACAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGGTACAAGCAGGGCCAGAACCCAGC TCTATAACGAGCTCAATCTAGGAGGAAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGT GGCCGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGAACCCCTCAGGAAGCCCTG TACAATGAACCTGAGAAAGATAAGATGGCGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAG GCGAGCGCGGAGGGCAAGGGCCAGTGGCCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC CAAGGACACTACGACCCCTTCACATGAGGCCCTGCCCCCTCGC
10	CD3-zeta (aa) (Secuencia de referencia del NCBI NM_000734.3)	RVKFSRSDAPAYQQGNQLYNELNLRREEYDVLKRRRDRPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQDKMVAEYSEIGMKERRRGKHDGLYQGLSTATKDYDALHMQLPPR
21	CD3-zeta (na) (Secuencia de referencia del NCBI NM_000734.3)	AGAGTGAAGTTACAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCGGGCCAGAACCCAGC TCTATAACGAGCTCAATCTAGGAGGAAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGT GGCCGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCCTG TACAATGAACCTGAGAAAGATAAGATGGCGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAG GCGAGCGCGGAGGGCAAGGGCCAGTGGCCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC CAAGGACACTACGACCCCTTCACATGAGGCCCTGCCCCCTCGC
36	CD28 Dominio intracelular (secuencia de aminoácidos)	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS
37	CD28 Dominio intracelular (secuencia de nucleótidos)	AGGAGTAAGAGGAGGAGGCTCTGACACAGTGACTACATGAACATGACTCCCGCGGCC CGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCACCACCGGACTTCGCAGCCTATCG CTCC
38	ICOS Dominio intracelular (secuencia de aminoácidos)	T K K K Y S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K S R L T D V T L
39	ICOS Dominio intracelular (secuencia de nucleótidos)	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCAGCACCCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAG AGCAGTAAACACAGCCAAAATAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA
5	Bisagra/enlace GS (aa)	GGGGSGGGG
16	Bisagra/enlace GS (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
356	Bisagra/enlace GS (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGGTTCC
25	enlazador	GGGG
26	enlazador	(Gly-Gly-Ser) ⁿ , donde n = 1-6, por ejemplo, GGGGSGGGG GGGGSGGGG
27	enlazador	(Gly ⁴ Ser) ⁴
28	enlazador	(Gly ⁴ Ser) ³
29	enlazador	(Gly ³ Ser)

(continuación)

SEQ ID NO	Descrip.	Secuencia
24	PD-1 CAR (aa) con señal (PD1 ECD subrayado)	<p>MaIpvtallplallhaarppgwfldsdpdrpwnppftfspallvvtgednaftcfsfsntsesflnwyrmspsnqt dklaafbedrsqpgdcrfvtlpngrdfhmsvvairmdsgtlvcgaislapkaqikeslraelrvterraevpta hpspsrpagqftlvtttppaprptptiasqplsirpeacrpaaggvhtrgdfacdiyiwaplagtcgvllsl vitlyckrgrkkllyfkqpfmrpvqtteedgcscrfpeeeggcelrvksrsadapaykgqnqlynelnlgrre eyvdldkrgrdpemggkprrknpqeglynelqdkmaeyseigmkgerrnghgdlyaglstatkdydal hmqalppr</p>
338	Dominio citoplasmático de PD1 (aminoácidos 192-288)	CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGE LD FQWREK TP PEPPVPCVPEQTEY ATIVFSGMG TSS PAR RG SADG PR SAQ PLR PE DG HCSWPL
339	Dominio citoplasmático (aminoácidos 183-223)	AVSLSKMLK KRS PLTTGVYV KMP PTPEPECEKQ FQ PYFI PIN
340	Bisagra CD8 humana	TTTTAPRRPT PAPTIASQPL SLRPEACRPA AGGAVHTRGL DFA

En el presente documento se proporcionan además secuencias ejemplares de NKR-CARs, y componentes de NKR-CARs.

5 A continuación se proporciona la secuencia de ácido nucleico de un KIR-CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a la mesotelina y un dominio citoplasmático que comprende un dominio KIR2DS2. Cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en el presente documento puede ser sustituido por el dominio de unión a antígeno de mesotelina proporcionado a continuación.

Secuencia del gen **SS1 KIR2DS2** (SEQ ID NO: 327)

gtgcacgagtggggtacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttt
 taaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgattgacccgggcaagagcaactcggcgcgcataactattctcagaatgacttggt
 gaggactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtctgccataacctgagtgataaactgc
 ggccaactactctgacaacgatcggaggaccgaaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgtg
 ggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccgatgctgtgcaatggcaacaaagttgcgcaaaactattaa
 ctggcgaactactactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccactctgcgctcggcccttc
 cggctggctggttattctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatgtaagccctcc
 cgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagca

ttgtaactgtcagaccaaagtactcatatatactttgattgattfaaaactcatttttaattaaaaggatctagggtgaagaccttttgataatc
tcatgacaaaaacccctaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatcctttttctgc
gctgaatctgtctgtgcaaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgtgttccggatcaagagctaccaactctttccgaaggtaa
ctggctcagcagagcgagataccaaatactgtcctctagtgtgaccgtagttagccaccactcaagaactctgtgacccgctacat
acctgctctgtactctgttacagtggtgctgccaagtggcgataatgctgtcttaccgggtgactcaagacgatgtaccggataa
ggcgacgagggtggctgaacggggggctgctgcacacagccagctggagcgaacgactacaccgaactgagatacctacagcgt
gagctatgaaaagcggcagcttccgaaagggaagggcagcggatccggtaagcggcagggctggaaaggagcgcac
gaggagcctccaggggaaacgctgtatcttatagtcctgtcgggttccaccctctgacttgagcgtcgtttttgtgctgtcag
ggggcgagcctatggaaaaacccagcaacgcggccttttaccggtcctggccttttctgccttttctcatatgtcttctgcgtta
tccctgattctgtgataaccgtatataccgctttgagtgagctgataccgctcggcagccgaacgacggcgcagcagtcagtgga
gcgagggaagcggaagcgcaccaatacgcaaacgctcctcccgcgcttggccgattcataatgacgctggcagcagaggttccc
gactggaaagcggcagtgagcgaacgcaatattgtgagtgactcactcattaggcaccgaagcggcaatfaaacctcactaaagg
atgtgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacaggaacagctatgacatgattaccgcaagcggcaatfaaacctcactaaagg
gaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagcttctgcaactctgtgacttgaacatggtaacgatgagtgcaacatgccttcaaa
ggagagaaaaagcaccgtgcatgcccgttggtaagtaagggtgacgctgtgcttattaggaaaggcaacagcggctgcatgg
attgagcaaacctgaattgccgattgagagatattgatftaaagtgctgactgatacaataaacgggtctctgtgtagaccagatct
gagcctgggagctctgtgtaactaggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctgagtgctcaagtagtgctcccgtctgt
gtgtgactctgtaactagatccctcagaccctttatgctggtgaaaactctagcagtgccggccgaacaggacctgaaagcga
agggaaccagagctctctcagcaggaactcggctgtgaagcgcgcacggcaagagcggcggggcggcggactggtgagtagcc
aaaaatttgaactcgggagggtagaaaggagagagatgggtcgaagcgtcagtagtaagcgggggagaattagatcggatgggaaa
aatcggftaaaggcagggggaagaaaaataaaatfaaaacatatagtatggcaagcagggagctagaacgattcgaatcct
ggcctgtaaaaacatcagaaggctgtagacaataactgggacagctacaacatccctcagacaggatcagaagaaatagatcattata
taatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaaggatagagataaaagacaccaagggaagctttagacaagatagaggaaagcaaac
ataaaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaaaaggaagagtggtgacagagaaaaagagcagtgaggaa
taggagcttcttgggttcttgggagcagcaggaaacactatggcgccagcctcaatgacgctgacggtagcagccagacaattattg
tctgtatagtcagcagcagaacaattgctgagggctattgagggcgaacagatctgttgaactcagctggtgggcatcaagcagct
ccaggcaagaatcctgctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctgggatttgggttctctggaaaaactcatttgcaccactg
ctgtccttggaaatgtagtggagtaataaatctctggaaagattggaatcacacgacctggatggagtggaagcagagaaatfaacaatta
cacaagcttaatacactccttaattgaaatcgcaaaaccagcaagaaagaaatgaacaaagatttggaaatgataaatggcaagttt
gtggaattggttaacatacaaaattggctgtgtatataaaatfatcataatgatagtaggagccttggtaggtttaaagaatgttttctgtac
ttctatagtaatagatgagcagggatattcaccattatcgtttcagacccaactcccaaccccgagggggagccgacagcggcgaagg
atagaaagaaagggtggagagagagacagagatccattcgaftagtgacggatctcgcaggtatcgaftagactgtgaccggga
atatggcagctagattgacacattagaaggaaaaattcttggtagcattcatgtagccagtgatataagaagcagaagtaattccag
cagagacagggcaagaaacagcatactcctcttaaaatfagcaggaaagatggcagtaaaaaagtagacatacagacaatggcagcaattt
caccagtactacgftaaaggcggcctgttgggtggcggggaatcaagcaggaatttggcattcctcaatccccaaagtcaaggagtaata
gaatctatgaataaaagattaaagaaaattataggacaggtaaagatcaggctgaacatctaaagacagcagtaacaaatggcagattcatc
caaatftaaaagaaaagggggattgggggtagcagtgaggggaaagaaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaaga
attcaaaaacaaatfaaaaaatcaaaatttccgggttatacaggagacagagatccaatttggctgcatacgcgtcgtgaggctccg
gtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgccacagctcccgaaggttgggggaggggtcggcaattgaaccgggtgctagagaag
gtggcggggtaaaactgggaaagtagtgcgtgtagctgctccgcttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcaatgtagc
ggcgtgaacgttcttttcgcaacgggttccgcagaaacacaggtaaagtccctgtgtgttccgaggcggcctgcttaccgggtat
ggccttgcgtgcttgaattactccacctgctgtagctgattctgacccgagcttgggttggaaagtgggtgggagatgtaggg
ccttgcgttaaaggagccccttgcctcgtctgtgagttgagcctggcctggcgctggggccgctgcaatctggtggcaccctc
gcgctgtctcgtcttccgataagctctagccattfaaaattttgatgacctgctgcagcctttttctggcaagatagcttgaatgag
ggccaagatctgcacactgtagtcttgggtttggggcggggcggcagggggcccgctgctccagcgcacatgttccggcagggc

gggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggctggcctcgcgcccgctgt
atgccccccctggcggaagcctggcccgtcgccaccagtgcgtgagcggaaagatggccgctcccggccctgctcagggga
gctcaaaatggaggacgcggcctcgggagagcggcggtgagtcaccacacaaaggaaaaaggcctttccgtcctcagcgcgtcgc
ttcatgtactccagcggagaccggcgcctccagccacctcgtatgctctgcttttgagtagctcgtctttagggtgggggaggg
gtttatgcatggagttccccactgagtggtggagactgaagttaggccagctggcactgatgaattctccttgaattgccctttt
gagttggatctgttcattctcaagcctcagacagtggtcaaagtttttctcatttcaggtgctgtagctagaATGGGGGGAC
TTGAACCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCG
TCCTGTCCAGGCCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGT
GCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGCTCATTGCCCTGGCCGT
GTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCC
GGAAACAGCGTACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAAGG
TCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAA_gTCGAGGGCGG
CGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAAATCCCGGCC
CTAG_gatggccttaccagtgaaccgcttgcctcctgctcctcagcctgctccacgccccaaggcgggatcccaggtaacaactgca
gcagtctggcctgagctggagaagcctgagcgttcagtgaaagatacctgcaaggcttctggtactcattcactgctacacatgaactg
ggtgaagcagagccatggaaaagcctgagtggtgacttattactccttaaatggtgcttctagctcaaccaagttcaggggca
aggccacattaactgtagacaagtcatccagcacagcctacatggacccctcagctgacatctgaagactctcagctctattctgtgcaag
ggggggttacgacgggaggggtttgactactgggccaaggaccacggctaccgtctcctcaggtggagggcgttcagcggcgggt
ggctctagcgggtggtgatcggacatcgaactcactcagctccaatcatgctgcatctcaggggagaa_ggtcacatgacactgca
gtgccagctcaagttaagttacatgcaactggtaccagcaaaagtcaggcactccccaaaagatggattatgacacatccaaactggct
tctggagtcaccagctcctcagtggtcagtggtctgaaacttactctcaaatcagcagcgtggaaggctgaagatgatgcaacttat
tactgcccagctggagtaagcaccctctcagctacggctgggacaaagttggaatcaaagctagcACGCGT_ggtgcccaggg
ttctggaggtgggggttcccaggggctggccacatgagggagtcacagaaaacctcctcctgcccacccaggtcccctggtgaa
atcagaagagacagctcctgcaatggtgctcagatgcaaggttggcactccttctgcaagagaggggaa_ggataaggacactttgca
cctcattggagagcaccatgatgggtctccaaggccaacttctccatcggtcccatgatgcaagacctgcaagggaactacagatgctacg
gttctgtactactccccatcagttgctcagctcccagtgaccctctggacatcgtcatcacaggcttatatgaaaccttctctcagccc
agccgggccccacgggtttggcaggagagagcgtgacctgtcctgcaactcccggagctcctatgacatgacctatccaggggg
gggagggccatgaacgtaggttctcaggggcccaaggtcaacgggaacattccaggccgacttctcctgggcccctgcaccccagggag
gaacctacagatcttggctcttccctgactctccctatgagtggtcaaaactcagtgaccctgcttcttctgacagaaaccttca
aatagttggccttaccactgaaccaagctccaaaacgggtaaccccaagacactcctgctgctgtaagggagcctgcaagggaacagacag
tgaacagcggaggtctgatgaacaagaccatcaggaggtgtcatacgcataaGtcgacaatacctctggattacaaatgtgaaaga
ttgactggtattcttaactatgtgctcctttacgctatgtggatacgtctttaa_gcctttgatactgctattgctcccgtatggcttctattct
cctcctgtataaatcctggtgctgtctctttatgaggatgtggtggccgtgtcaggcaactggtgctgctgctgctgctgctgctgctgca
ccccactggttggggcattgccaaccctgtcagctccttccgggacfttcccttcccctcctattgccacggcggaaactcctcgg
cctgcttggcccctgctgagacaggggctcggctgttggcactgacaattccgtggtgtgctggggaa_gctgacgtccttccatggctg
ctgctgctgttggccactgattctgctgctgggacgtccttctgctacgtccctcggccctcaatccagcggaccttctcccgcgctg
ctgcccgtctgctgctccttccgctcttccctcgcctcagacgagctcggatcctccttgggcccgcctcccgcctggaattcagact
cggtaactttagaccaatgacttaaaagcagctgtatgactttagccacttttaaaagaaaagggggagctggaagggtactaactcctcc
aacgaagacaagatctgcttttctgactggtctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggtactaactggaaccact
gctaaagcctcaataaagcttgccttgaactcctcaagtagtgtgcccgtctgtgtgactctgtaactagatccctcagaccctttaa
gtcagtgfgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattttagctattataactgcaaa_gaatgaatatcagagagtgaggaa
ctgtttatgtagccttataatggttcaataaagcaatagcatcacaatattcaataaaagcatttttctactgacttctggtgtgttgc
aaactcatcaatgtatcttactgctgctctagctatcccggcccctaacctccgccagttccgcccttctcccctatgctgactaattt
ttttattatcagagggccagggccctcggcctctgactattcagaagtagtgaggagggctttttggaggcctacgcttttgcgtcag
acgtaccaatcgcctatagtgagctgtattacggcgtcactggcgtcttttacaacgtcgtgactgggaaaacctggttacc

aacttaatgccttgcagacatcccccttccagctggcgtaatagcgaagaggcccaccgatcccttccaacaggttgcgcag
cctgaatggcgaatggcgcgacgcgccctgtagcggcgcatlaagcggcggggtgtgtggttacgcgcagcgtgaccgctacactg
ccagcgccttagcggcctccttctccttctccttctccttctcctcggcactgctcggccttcccctcaagctctaaatcggggctcctt
tagggctccgatttagctttacggcactcctcagccccaaaaactgattagggtgatggttcagtagtggccatcgcctgatagacgg
ttttccctttagcgttggagctccagcttcttaatagtgactcctgttccaaactggaacaactcaaccctatctcgtctattctttgatt
ataagggtttgcccatttgcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaat_gtaacgcaattttaa_gcaaaatattaactgttaacatt
cccaggtggcactttcggggaaatgtgctgcaacccctattgttttttctaaatacattcaaatatgactccgtcatgagacaataacc
ctgataaatgcttcaataatgaaaaggaaagatgagattcaacatttccgtgctgccttattccctttttgctggttttgccttctgt
ttttgctacccagaaactggtgaaagtaaaagatgctgaagatgattg

A continuación se proporciona la secuencia de ácido nucleico de un KIR-CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a la mesotelina y un dominio citoplasmático que comprende un dominio KIRS2. Cualquiera de

los dominios de unión a antígeno descritos en el presente documento puede ser sustituido por el dominio de unión a antígeno de mesotelina proporcionado a continuación.

Secuencia del gen SS1 KIRS2 (SEQ ID NO: 328)

gtgcacgagtgagggtacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttt
 taaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgcccgggcaagagcaactcggctcggcgataactattctcagaatgacttgggt
 gagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtctgccataacctgatgataacaatcgc
 ggccaacttactctgacaacgatcggaggaccggaaggagctaacggctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttg
 ggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactatfaa
 ctggcgaaactacttactctagcttcccggcaacaataatagactggatggaggcggataaaagttgcaaggaccactctcgcctcggccttc
 cggctggctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgggtatcattgagcactggggccagatggtaagccctcc
 cgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagca
 ttgtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcattttaattaaaggatctaggtgaaagaccttttgataatc
 tcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatcctttttctgc
 gcgtaatctgctgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgttttggccgatcaagagctaccaactcttttccgaaaggtaa
 ctggcttcagcagagcgcgagataccaaatactgctctctagtgtagccgtgtagtgcccaacttcaagaaactctgtagcaccgctacat
 acctgctctgctaatctctgttacagtggtgctgctccagtgccgataagtcgtgtctaccgggtggactcaagacgatitaccggataa
 ggccgagcggctgggtgaaacgggggtctgctcacaagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgt
 gagctatgagaagcggcagcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagggctggaaacaggagagcgcac
 gaggggagcttccagggggaaacgctgctatcttatagtcctgtcgggttccaccctctgactgagcgtcgtttttgtagctcgtcag
 gggggcggagcctatggaaaaacggcagcaacgcggccttttacggctcctgcttctgctgcttttctcactgctcactgctgctgta
 tcccctgattctgtgataaccgtattaaccgctttagtgagctgataccgctcggcagccgaacgaccgagcgcagcagtgatgagtg
 gcgaggaagcggagagcggccaatacgcacaacccctctcccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcagcagaggttccc
 gactggaaaagcggcagtgagcgcgaacgcaatfatgtgagttagctcactcattaggcaccacaaggcttacttacttctccggctcgt
 atgttgtgtggaattgtgagcggataacaatftcacacaggaacaagctatgaccatgattacgcaagcgcgcaatfaaccctcaataaagg
 gaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagtcttatgcaatactctttagtcttgaacatggtaacgatgagttagcaaatgccttaaca
 ggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaagtggtgacgatcgtgccttattaggaaaggcaacagcgggtctgacatgg
 attggaacgaaccactgaattgccgattgcaagatattgtatttaagtgctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatc
 gagcctgggagctctctggctaaactaggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctttagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgtt
 gtgtgactctgtaactagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaactcttagcagtgccgcccgaacaggacctgaaagcgaa
 agggaaaccagagctctctcagcagcagactcggcttctgaagcgcgcacggcaagagcggggggcggcactggtgagtaagcc
 aaaaatgttactagcggagggctagaaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtaataagcggggggaatagatcggatgggaaa
 aaatcgggttaaggccaggggggaaagaaaaataataataaaacatatagtatgggcaagcaggggagctagaacgattcgaatgtaactct

ggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaactgggacagctacaacatccctcagacaggatcagaagaaacttagatcattata
 taatacagtagcaacccctctattgtgtcatcaaaaggatagataaaagacaccaaggagcttttagacaagatagaggaaagcaca
 aaaaagtaagcaccgcacagcaagcggccgctgatctcagacctggaggagagatagaggacaattggagaagtgaattatataa
 atataaagtagtaaaaatgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtggtgcagagaaaaagcagctgggaa
 taggagctttgtccttgggttctgggagcagcaggaaacactatggcgcagcctcaatgacgctgacggtaacggcagcaattattg
 tctgtatagtcagcagcagaacaatttctgagggctattgagcgcacaacgactctgttcaactcagctctgggcatcaagcagct
 ccaggcaagaatcctggctgtgaaaatacctaaaggatcaacagctcctggggattggggctctggaaaactcattggaccactg
 ctgtccttggaatgctagtggagtaataaatctctggaaagattggaatcacacgactggatggagtgggacagagaaatcaaat
 caaagcttaatacactccttaattgaaagatgcaaaaacagcaagaaaaaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtt
 gtggaattggttaacatacaaaattggctgtgtatataaaattatcataatgatagtaggagcttggtaggtttaagaatggtttgctgac
 tttctatagtgaatagagtaggcaaggatattcaccattatcgttcaaccaactcccaacccaggggagccgacagcggccgaaggga
 atagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgaatgtaacggatctcgacggatcagattagactgtagccagga
 atatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaaattatcttggtagcagttcatgtagccagtgatataagaagcagaagttaattccag
 cagagacagggcaagaaacagcatactcctcttaaaatagcaggaagatggccagtaaaaaagtaacatacagacaatggcagcaatt
 caccagtaactagttaaaggccgctgttgggtggcggggaatcaagcaggaatttggcattccctacaatccccaaagtcaaggagtaata
 gaattctatgaataaaagaataaagaaaatataaggacaggtaaagatcaggtgaacatctaaagacagcagtaacaaatggcagattcatc
 cacaaatataaaagaaaagggggattggggggtacagctcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaaga
 attcaaaaacaaatcaaaaatcaaaaatctgggtttatcagggacagcagagatccagtttggctgcatacgcctgtgagggctccg
 gtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcacacagcctccggaaggtgggggaggggtcggcaattgaaaccggtgctagagaag
 gtggcgcggggtaaactgggaaagtgtgtgactgctgctcccttttcccgagggtgggggagaaaccgtatataagtcagtagtgc
 gccgtgaaactgttttcccaacgggtttccgcagaaacacaggtgaagtccctgtgtgttcccgccgctgctcctttacgggttat
 ggccctgctgcttgaattactccactggctgcaatcctgattcctgagctccgagcttccgggttgaagtgggtgggagagttcagag
 ccttgcctaaaggagcccctcctcgtgcttgaagtgaaggcctggcctggcctgctggcggcggcctgctcgaatctggtggcactc
 ggcctgtctcgtctgttgcataagctctagccattaaaaatfittgatgacctgctgcagcgttttttctggcaagatagcttgaatgctg
 ggccaagatctgcacactgatttctgttttggggccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gggcctgcgagcgcggcaccgagaatcggagggggtagtcaagctggccggcctgctctggtgcttggcctgcgcccgtgt
 atgccccccctggcggcaaggctggcccgtcgccacagatgctgagcggaaagatggccgctcccgccctgctcagggga
 gctcaaaatggaggacgcggcgtcctggagagcggcgggtgagtcaccacacaaaggaaaaaggccttccgtcctcagcctcgc
 ttcattgtactccagagtagcgggcccgtccaggcacctcagattgtctctgtctttggagtagctgctttaggttgggggaggg
 gtttatgcatggagtttccccactgagtggtggagactgaagttagccagcttgcaactgatgaattctccttgaattgcccctttt
 gagttggatcttggctcattcaagcctcagacagtggtcaaagtttttctccattcaggtgtcgtgagctagaATGGGGGGAC
 TTGAACCCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCG
 TCCTGTCCAGGCCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGT
 GCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGTGACAGTGCTCATTGCCCTGGCCGT
 GACTTCTGCGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCC
 GGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCCAGAGG
 TCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAAgTCGAGGGCGG
 CGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCC
 CTAGGatggccttaccagtgaccgccttgcctcctgctcctcagccgccaaggccggatcccaaggtacaactgca
 gcagctgggctgagctggagaagcctggcgttcagtgaaatatacctgcaaggcttctggttactcattcactggctacacatgaactg
 ggtgaagcagagccatggaaaagccttgaagtgattggaattattactccttaaatggtgcttctagctacaaccagaagttcaggggca
 aggccacattaaactgtagacaagatcaccagcacagcctacatggacctcctcagctgacatctgaagactctgagctctattctgtgcaag
 ggggggttacgacgggaggggtttgactactgggccaaggaccacggctcactcaggtggagggcggttcagcggcgggt
 ggctctagcgggtgtgacatcgactcactcagctcagcaatcatgtctgcatctcaggggagaaaggtcaccatgacctgca
 gtgccagctcaagtgaagtacatgactgtagcagaagtcaggcacctccccaaaagatggattatgacacatcaaaactggct
 tctggagctccaggtcctcagtgggcagtggtctgaaactcttactctcaaatcagcagcgtggaaggctgaagatgatcaacttat

tactgccagcagtgaggtaagcacctctcacgtacggctgggacaaagtggaaatcaagctagcgggtggcggagggttctggagggt
 ggggggttctcaccctcgaaccaaagctccaaaaccggtaaccacagacacctgcatgttctgattggacctcagtggtcaaaatcccttt
 caccatcctcctctcttctcctctcatcgctggctccaacaaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcagggaacaagaagcgt
 gaacagcagagattctgatgaacaagaccatcaggaggtgtacacgataaGtcgacaatcaacctctggattcaaaattgtgaaagat
 tgaactgtattcttaactatgttctctttacgctatgtggatacgtgcttaatgctttgatcatgctattgcttcccgtatggtttcattttct
 cctcctgtataaatcctggtgctgtctttatgaggagtgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgctcactgtgttggctgacgcaa
 cccccactggttggggcattgccaccctgtcagctccttccgggacgttcccttccccctcctattgccacggcggaaactatcgcg
 cctgcttggcccgtgctggacaggggctcggctgtggcactgacaattccgtggtgtgctggggaaagctgacgtccttccatggctg
 ctgcctgtggtgccacctgattctgcgaggcgtccttctgctacgtccctcggccctcaatccagcggaccttctcccgcgctg
 ctgcccgtcctgcgccccttccgcgtcttccctcgcctcagacgagctcggatcctccttggggcgcctcccgcctggaattcagct
 cggtaaccttaagaccaatgacttaaaagcagctgtatgacttaccacttttaaaagaaaaggggggactgaaagggtcaattcactccc
 aacgaagacaagatcgtcttttctgtactggtgctctctggtfagaacagatctgagcctggagctctctggctaactagggaaaccact
 gctaaagcctaataaagcttgccttgaagctcaagtagtgtgcccgtctgttgtgactctgtaactagagatccctcagacccttta
 gtacgtgtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattttagtattataacttgcaagaaatgaatatcagagagtgaggaa
 ctgtttatgtcagcttataatggttcaaaataaagcaatagcatcacaatttcaaaataaagcatttttctactgcattctagtgtggttgc
 aaactcatcaatgtatcttcatgtctggtctatgctatcccggcccctaactccgccagttccgcccttctcccctcagctgactaatttt
 ttttattatgcagaggccgagccgctcggcctctgagctattcagaagtagtgaggaggctttttggaggcctacgcttttgcgtcag
 acgtacccaattcgcctatagtgagctgtattacgcgcgctcactggccgtcttttacaacgtcgtgactgggaaaaacctggcgtacc
 aactaaatgccttgcagcacatcccccttccagcgtggcgttaataagcgaaggcccgaccgatcgccttccaacagttgctcag
 cctgaatggcgaatggcgcgacgcgcctgtagcggcgttaagcggcggcgggtgtggtgtaacgcgcagcgtgaccgctacacttg
 ccagcgcctagcgcctccttctgcttctccttctccttctcgcacgttccggccttcccgtcaagctctaaatcggggcctcctt
 tagggttccgatttagtctttacggcaccctgacccccaaaaacttgattagggtgatgttcaagtagtggccatcgcctgatagacgg
 ttttcccttgcagcttggagctccagcttcttaatagtggactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcgtctattctttgatt
 atagggtatttgcgatttccgctattggttaaaaaatgagctgatttaaaaaaattaacgcgaatttaaaaaataaaactttacaatt
 cccaggtggcacttttccgggaaatgtgcgcggaacccctatttcttattttctaaatacattcaataatgtatccgctcatgagacaataacc
 ctgataaatgcttcaataatgaaaaaggaaagatgagatgattcaacatttccgtgctcgccttattccctttttgcccattttgccttctgt
 tttgctcaccagaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaaagatcagttgg

A continuación se proporciona la secuencia de ácido nucleico de un KIR-CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a la mesotelina y un dominio citoplasmático que comprende un dominio KIR2DL3. Cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en el presente documento puede ser sustituido por el dominio de unión a antígeno de mesotelina proporcionado a continuación.

5

Secuencia del gen SS1 KIR2DL3 (SEQ ID NO: 329)

gtgcacgagtgaggtaacatcgaactggtatcacaagcggtaagatccttgaagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttt
 taaagtctgctatgtggcgcgtattatcccgtattgacggggcaagagcaactcggctcggccatacactattctcagaatgacttgggt
 gactactcaccagtcacagaaaagcatcttaccggtatggcatgacagaaagaaatgcaagtgctgctccataacatgagtgataaactgtc
 ggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaaggagctaacgctttttgcaacaatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttg
 gaaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacacacgatcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaa
 ctggcgaactactactctagcttcccggcaacaataatagactggatggagcggataaaagttcagggaccaacttctgcgctcggccctt
 cggctgctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcaactggggccagatggtgaagccctcc
 cgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaaagca
 ttgtaactgtcagaccaaagttactcatatatactttgattgatttaaaactcatttttaaaagggatctaggtgaagatccttttgataatc
 tcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaagatcttcttgaatcctttttctgc

gctcaaaatggaggacgcggcgcctcgggagagcgggcggtgagtcacccacacaaaggaaaaaggcctttccgtcctcagccgtcgc
 ttcattgtactccacggagtagccgggcccgtccaggcacctcagattgtctcgtctttggagtagctcgtcttttaggtgggggaggg
 gttttatgcatggagtttccccacactgagtggtgggagactgaagttagccagcttgcaactgatgtaattctccttgaattgccctttt
 gagtttgatcttggtcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttctcatttcaggtgtcgtgagctagaATGGGGGGAC
 TTGAACCCCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCG
 TCCTGTCCAGGCCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGT
 GCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGTGACAGTGCTCATTGCCCTGGCCGT
 GTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCC
 GGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCCAGAGG
 TCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAAgTCGAGGGCGG
 CGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCC
 CTAGGatggccttaccagtgaaccgcttgcctcctgcccctggccttgcctccacgcccgccaggccggatcccaggtaacaactgca
 gcagtctggcctgagctggagaagcctggccttcaagatacctgcaaggcttctggttactcattcactggctacacatgaactg
 ggtgaagcagagccatggaagagccttgagtgattggacttattctccttaaatggtgcttctagctacaaccaagaattcaggggca
 aggccacattaactgtagacaagtcacacagcctacatggacctcctcagctgacatctgaagactctgcagctctattctgtgcaag
 ggggggttacgacgggaggggtttgactactgggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtggagggcgggtcaggcggcggg
 ggctctagcgggtggtgacatcgactcactcagctccagcaatcatgctgcatctccaggggagaaagtcacatgaactgca
 gtgccagctcaagtgaagttacatgcaactgtaccagcagaagtgcagccacccccaaaagatggattatgacacatccaaactggct
 tctggagctccaggtcctcagtggtcagtggtctgaaactcttactctcacaatcagcagcgtggaaggctgaagatgatgcaactat
 tactggcagcagtgagtaagcaccctctcagctacggtgctgggacaaagtggaaatcaaagCTAGCgggtggcggagggtctgga
 ggtgggggtccCAGGGGCCTGGCCACATGAGGGAGTCCACAGAAAACCTTCCCTCTGG
 CCCACCCAGGTCCCCTGGTGAAATCAGAAGAGACAGTCATCCTGCAATGTTGGTCA
 GATGTCAGTTTTACGACTTCTTCTGCACAGAGAAGGGAAAGTTTAAGGACACTTTG
 CACCTCATTGGAGAGCACCATGATGGGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCCATCGGTCCC
 ATGATGCAAGACCTTGCAGGGACCTACAGATGCTACGGTTCTGTTACTCACTCCCC
 TATCAGTTGTCAGCTCCCAGTGACCCTCTGGACATCGTCATCACAGGTCTATATGAG
 AAACCTTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCACCGTTCTGGCAGGAGAGAGCGTGAC
 CTTGTCCTGCAGCTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGA
 GGCCCATGAACGTAGGTTCTCTGCAGGGCCCAAGGTCAACGGAACATTCCAGGCCG
 ACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGAACCTACAGATGCTTCCGGCTCTTTCC
 GTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAACCTCGAGTGACCCACTGCTTGTCTGTCCACAG
 GAAACCTTCAAATAGTTGGCTTTCACCCACTGAACCAAGCTCCGAAACCGGTAACC
 CCAGACACCTGCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCATCATCCTCTTCACTCCT
 CCTCTTCTTTCTCCTTCATCGCTGGTGTGCAACAAAAAATGCTGTTGTAATGGAC
 CAAGAGCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGGGAGGACTCTGATGAACAAGACC
 CTCAGGAGGTGACATATGCACAGTTGAATCACTGCGTTTTACACAGAGAAAAATC
 ACTACCCCTTCTCAGAGGCCCAAGACACCCCAACAGATATCATCGTGTACACGGA
 ACTTCCAAATGCTGAGCCCTGAGTgcacaatcaactctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaacta
 tgtgctcctttacgctatgtggatagccttctaatgctttgatcatgctattgctcccgatggccttctcctccttataaatcctg
 gttgctgctctttatgagaggtgtgcccgtgtcagcaacgtggcgtggtgtgactgtttgctgacgcaacccccactggtggggc
 attgccaccactgctcagctccttccgggacttctccttccccctccattgccacggcggaactcatcgccgctgcttcccgtgct
 ggacaggggctcggctggtgggactgacaattccgtggtgtgtcggggagctgacgtccttccatggctgctcgcctgtgtgccact
 ggattctgcgggagctccttctgctacgtccctcggcctcaatccagcgaccttccctcccgccgctgctgcccgtgctgcccct
 ctcccgctctcctcgcctcagacagatcggatcctccttggcggcctccccgctggaattcagctcggtaacctttaagaccaat
 gacttaaaaggcagctgtagatcttaaccacttttaaaagaaaaagggggactggaagggtaattcactcccaacgaaagacaagatctg
 ttttgcctgactgggtctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagc

ttgccttgagtcttcaagtagtgtgtgccgtctgttgtgtgactctggtaactagatccctcagacccttttagtcagtgtgaaaatctcta
 gcagtagtagtcatgtcatcttatttcaagtattataacttgcaaaagaatgaatatcagagagtgaaggaaactgtttattgcaacttaaat
 ggttaaaaataagcaatagcatcaaaattcaaaaataagcattttttcactgcaattctagttgtgtgttgcctcaactcatcaatgtatcttat
 catgtctggctctagctatcccggcccctaaactccgcccagttccgcccattctcccccctggctgactaatttttttattatgacagggccg
 aggcgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggcctttttggaggcctacgcttttgcgtcgagacgtaccatcgcctta
 tagtgagctgtattacgctcactggcctgcttttacaacgctgctgactgggaaaaacctggcgttaccactaatcgccttgacgc
 acatcccccttgcagcgtggcgttaatacggaaaggccgcaccgatgccttcccaacagttgagcagcctgaatggcgaatggcg
 cgagcgcctgtagcggcgcaatacggcggcggtgtgtgtgttacgagcagcgtgaccgctacactggcagcgcctagcgcctg
 ctctttcgtttcttccctctcttctcggcacgttcggcgttccctcctcaagctctaaatcggggctccctttaggggtccgatttagtct
 ttacggcacctcagcccaaaaacttgattagggtgatggttcaagtagtgggccatgccttgatagcggttttcgcctttgacgttgg
 agtccaagtcttaataagtgactcttctcaaaactggaacaactcaacctatctcggctattcttttgattataaggattttccgattt
 cggcctattggttaaaaatgagctgatttaaaaaatftaacggaattftaacaataatgacgtttacatttccaggtggcacttttcgg
 ggaaatgtgagcggaaaccctattgtttattttctaaatacattcaaatatgatccgctcatgacaataacctgataaatgcttcaataata
 ttgaaaaaggaaagatgatgattcaacatttccgtgctgccttattccctttttgcggcattttgccttctgttttgcacccagaaacgct
 ggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgg

A continuación se proporciona la secuencia de ácido nucleico de un KIR-CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD19 y un dominio citoplasmático que comprende un dominio KIR2DS2.

Secuencia del constructo CD19 KIR2DS2 (SEQ ID NO: 330)

gtgcacgagtggttaccatgaaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttccaatgatgagcacttt
 taaagtctgctatgtggcgcgtattatcccgtattgacgcggcgaagcaactcggctcggcgcatacactattctcagaatgacttgggt
 gagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcaagtctgccataaccatgagtataaacactgc
 ggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaaggagctaacggctttttgcacaacatgggggacatgtaactgccttgatcgtg
 ggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaa
 ctggcgaactactactctgacttcccggcaacaataatagactggatggaggcggataaaagtgcaggaaccaactctgcgctcggccttc
 cggctggctggttattgctgataaactggagccgggtgagcgtggtctcggctatcattgagcactggggcagatgtaagccctcc
 cgtatcgtatgattctacacgagcggggagtcaaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcctgagataggtgcctcactgattaagca
 ttgtaactgtcagaccagttactatatactttgattgatttaaaactcaatttttaaaaggatctaggtgaaagatccttttgataatc
 tcatgacaaaaatcccttaacgtgattttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatcctttttctgc
 gcgtaactctgctgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgttttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaggttaa
 ctggctcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtgaccgtgtagggccaccactcaagaaactctgtagcaccgctcat
 acctcgtctgctaatcctgttaccagtggtgctgccaagtggcgataaagctggtctaccgggttgactcaagacgatagttaccggataa
 ggcgagcggctcgggtgaacgggggtctgctcacacagccagcctggagcgaacgacctacaccgaaactgagatacctacagcgt
 gagctatgagaaagcggcctcctccgaaagggaagggcggacaggtatccggttaagcggcagggctggacaaggagagcgcac
 gagggagcttcagggggaaacgctgtatcttatagtcctgtcgggttccacactctgactgagcgtcgtttttgtagtctcgtcag
 gggggcggagcctatggaaaaacggcagcaacgcggccttttacggctcctgctgcttttgccttttgccttttgcctattctctcgcgta
 tcccttgattctgtgataaacggtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcagccgaacgacggcgcagcagtgagtgga
 gcgaggaaagcggaaagcggcccaatacgcacaacccctctcccgcgcttggccgattcattaatgacagctggcagcagaggttccc
 gactggaaagcggcagtgagcgcacagcaatfatgtgagttagctcactcattaggcaccagcgtttacactttatgcttccgctcgt
 atgtgtgtgaaatgtgagcggataacaattcacaaggaacagctatgacatgattacgccaagcgcgcaatfaacctcaaaagg
 gaacaaaagctggagctgcaagccttaatgtagtctttagcaactctttagtcttgaacatggttaacgatgtagcaacatgcttcaaa
 ggagagaaaaagcaccgtgcatgcccattgggtgaaagtaagggtgtagatgctcctttaggaaggcaacagcggctgcataggg
 attggacgaaccactgaattgccgattgagagatattgtatttaagtgctcagatgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatct
 gagcctgggagctctctggtaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgccgtctgtt

TGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCAC
TCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAAC
ACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGC
TGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACG
CGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT
AATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTAT
TTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGA
TAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC
GCCCTTATCCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCCCTGTTTTTGTCTCACCCAGAAACGCT
GGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAC
TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA
TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCG
GGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACT
CACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGT
GCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGA
GGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCCT
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAC
GATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTAC
TCTAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGAC
CACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG
GTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCC
GTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGA
CAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTT
TACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGG
TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCT
GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGT
GCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCA
GATACCAATAAGTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGCT
TGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG
TGCGGATAAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGACTCAAGACGATAGTTACC GGATAAAGC
GCAGCGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGA
CCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGC
GCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC TGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTC
GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGTCCTTTTG
CTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTT
TGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGA
GCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTTCCCCGCGCGTTGGCCG
ATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCG
CAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTAT
GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAA
CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAGCT
TGCATGCCTGCAGGTCGACATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGC

CTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCT
 GTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTA
 GTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCT
 ACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTG
 GAACAGATTATTCTCTACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACT
 TTTGCCAACAGGGTAATACGTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAA
 ATAACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGGCGGATCTGAGGT
 GAAACTGCAGGAGTACAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCA
 CATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTCGCCAGC
 CTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATAC
 TATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCA
 AGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGC
 CAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTC
 AGTACACCGTCTCCTCAgctagcACGCGTggtggcggaggttctggaggtgggggtccaccctggtggtggtcgt
 gggcgctgctgggcagcctggtgctgtagtctgggtcctggcctcatctgctcccggccgcacgaggacaataggagccaggc
 gcaccggccagcccctgaaggaggaccctcagccgtgctgtgttctctggtgactatggggagctggatttccagtggcgagagaaga
 ccccgagccccctgacctgtgtccctgagcagcggagatgccaccattgtcttcttagcggatgggcaacctatccccgcccg
 caggggctcagctgacggccctggagtgcccagccactgagcctgaggatggacactgctcttggccctctgaGGATCCCC
 GGGTACCGAGCTCGAATTCAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA ACTAGTGGCGCC

5 La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos codificadas que comprenden un NKR-CAR descrito en el presente documento, por ejemplo, un KIR-CAR, y que además comprenden una molécula adaptadora que interactúa con el NKR-CAR para facilitar la transducción de señales para activar la célula que expresa el CAR, por ejemplo, para aumentar la proliferación o la actividad citotóxica de la célula que expresa el CAR. Cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en el presente documento puede ser sustituido por el dominio de unión a antígeno en los constructos NKR-CAR proporcionados a continuación.

La secuencia de ácido nucleico de DAP12 es la siguiente:

ATGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGTTCTGCTCCTGCCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCT
 CTGTCCAGGTCCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGGAGCCCGGGCGTCTGGCAGGGATCGT
 GATGGGAGACCTGGTCTGACAGTGTCTCATTGCCCTGGCCGTGTAATTCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGG
 GGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTGCCTTATCAGGAGC
 TCCAGGGTCTCAGAGTCTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAATGA
 (SEQ ID NO: 367)

10 La secuencia de aminoácidos del DAP12 es la siguiente:

MGGLEPCSRFLLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALA
 VYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPPYK
 (SEQ ID NO: 368)

La secuencia de ácido nucleico de FceRg es la siguiente:

ATGATTCCAGCAGTGGTCTTTGCTCTTACTCCTTTTTGGTTGAACAAGCAGCGGCCCTGGGAGAGCCTCAGC
 TCTGCTATATCCTGGATGCCATCCTGTTCTGTATGGAATTGTCTCACCCCTCCTCTACTGCCGACTGAA
 GATCCAAGTGCAAAAGGCAGCTATAACCAGCTATGAGAAATCAGATGGTGTTTACACGGGCTGAGCACC
 AGGAACCAGGAGACTTACGAGACTCTGAAGCATGAGAAACCACCACAGTAG
 (SEQ ID NO: 369)

La secuencia de aminoácidos de FceRg es la siguiente:

MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEK
 SDGVYTGSTRNQETTYETLKHEKPPQ

15 (SEQ ID NO: 370)

20 En el presente documento también se proporcionan secuencias de ácido nucleico para NKR-CARs multicadena que comprenden un NKR-CAR y una molécula adaptadora. En tales constructos, la secuencia de ácido nucleico del NKR-CAR y la molécula adaptadora están unidas por la secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de corte del péptido, por ejemplo, T2A. Estas moléculas de ácido nucleico se traducen como un polipéptido de cadena única antes de la escisión, y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de cadena única también se proporciona en este documento.

La secuencia de ácido nucleico y aminoácido de un NKR-CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a la mesotelina, por ejemplo, SS1, y un dominio citoplásmico KIRS2, así como una molécula adaptadora DAP12 unida a través del sitio de corte del péptido T2A se proporciona a continuación:

DAP12-T2A-SS1-KIRS2 (SEQ ID NO: 332)

5 **1464 pb de ADN**

CARACTERÍSTICAS	Ubicación
DAP12	1..339
Secuencia T2A	352..408
SS1-scFv	481..1200
GS-enlazador	1207..1236
Secuencia derivada de KIR2DS2	1237..1464

ATGGGGGGAC TTGAACCCTG CAGCAGGTTT CTGCTCCTGC CTCTCCTGCT GGCTGTAAGT
GGTCTCCGTC CTGTCCAGGT CCAGGCCAG AGCGATTGCA GTTGCTCTAC GGTGAGCCCC
GGCGTGCTGG CAGGGATCGT GATGGGAGAC CTGGTGCTGA CAGTGTCAT TGCCCTGGCC
GTGTACTION TGGGCCGGCT GGTCCCTCGG GGGCGAGGGG CTGCGGAGGC AGCGACCCGG
AAACAGCGTA TCACTGAGAC CGAGTCGCCT TATCAGGAGC TCCAGGGTCA GAGGTCGGAT
GTCTACAGCG ACCTCAACAC ACAGAGGCCG TATTACAAAG TCGAGGGCGG CGGAGAGGGC
AGAGGAAGTC TTCTAACATG CCGTGACGTG GAGGAGAATC CCGGCCCTAG GATGGCCTTA
CCAGTGACCG CCTTGCTCCT GCCGCTGGCC TTGCTGTCC ACGCCGCCAG GCCGGGATCC
CAGGTACAAC TGACAGCAGT TGGGCCTGAG CTGGAGAAGC CTGGCGCTTC AGTGAAGATA
TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA CTCATCACT GGCTACACCA TGAAGTGGT GAAGCAGAGC
CATGGAAAGA GCCTTGAGTG GATTGACTT ATTACTCCTT ACAATGGTGC TTCTAGCTAC
AACCAGAAAGT TCAGGGGCAA GGCCACATTA ACTGTAGACA AGTCATCCAG CACAGCCTAC
ATGGACCTCC TCAGTCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCAGTCT ATTTCTGTGC AAGGGGGGGT
TACGACGGGA GGGGTTTTGA CTACTIONGGC CAAGGGACCA CGGTCACCGT CTCCTCAGGT

GGAGCGGTT CAGGCGGGG TGGCTTAGC GGTGGTGGAT CGGACATCGA GCTCACTCAG
TCTCCAGCAA TCATGTCTG ATCTCCAGG GAGAAGGTCA CCATGACCTG CAGTGCCAGC
TCAAGTGTA GTTACATGCA CTGGTACCAG CAGAAGTCAG GCACCTCCCC CAAAAGATGG
ATTTATGACA CATCCAAACT GGCTTCTGGA GTCCCAGGTC GCTTCAGTGG CAGTGGGTCT
GGAACTCTT ACTCTCTCAC AATCAGCAGC GTGGAGGCTG AAGATGATGC AACTTATTAC
TGCCAGCAGT GGAGTAAGCA CCTCTCACG TACGGTGCTG GGACAAAAGTT GGAAATCAAA
GCTAGCGGTG GCGGAGGTT TGGAGGTGGG GGTTCTCAC CACTGAACC AAGCTCAAA
ACCGGTAACC CCAGACACCT GCATGTTCTG ATTGGGACCT CAGTGGTCAA AATCCCTTC
ACCATCCTCC TCTTCTTCT CTTTCATCG TGGTGCTCA AAAAAAAAAA TGCTGCTGTA
ATGGACCAAG AGCTGCAGG GAACAGAACA GTGAACAGCG AGGATTCTGA TGAACAAGAC
CATCAGGAGG TGTCATACGC ATAA

DAP12-T2A-SS1-KIRS2 (SEQ ID NO: 333)

10 **488 aa Proteína**

CARACTERÍSTICAS	Ubicación
DAP12	1..113
Secuencia T2A	118..136
Péptido_ señal de CD8alfa	138..158
SS 1-scFv	161..400
GS-enlazador	403..412
Secuencia derivada de KIR2DS2	413..487

Secuencia

MGGLEPCSRF LLLPLLLAVS GLRPVQVQAQ SDCSCSTVSP GVLGIVMGD LVLTVLIALA
 VYFLGRLVPR GRGAAEAATR KQRITETESP YQELQQRSD VYSDLNTQRP YYK VEGGGEG
 RGSLLTCGDV EENPGPRMAL PVTALLLPLA LLLHAARPGS QVQLQQSGPE LEKPGASVKI
 SCKASGYSFT GYTMNWVKQS HGKSLEWIGL ITPYNGASSY NQKFRGKATL TVDKSSSTAY
 MDLLSLTSED SAVYFCARGG YDGRGFDYWG QGTTVTVSSG GGGSGGGSS GGGSDIELTQ
 SPAIMSASPG EKVTMTCSAS SSVSYMHWYQ QKSGTSPKRW IYDTSKLSG VPGRFSGSGS
 GNSYSLTISS VEAEDDATYY CQQWSKHPLT YGAGTKLEIK ASGGGGSGGG GSSPTEPSSK
 TGNPRHLHVL IGTSVVKIPF TILLFLLHR WCSNKKNAAV MDQEPAGNRT VNSEDSDEQD
 HQEVSYA

La secuencia de ácido nucleico y aminoácido de un NKR-CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a la mesotelina, por ejemplo, SS1, y un dominio citoplasmático TNKp46, así como una molécula adaptadora FcεRy unida a través del sitio de corte del péptido T2A se proporciona a continuación:

5 **FCERG-T2A-SS1-TNKp46 (SEQ ID NO: 334)**

1365 pb de ADN

CARACTERÍSTICAS	Ubicación
FCERG	1..258
T2A	271..327
Péptido señal de CD8alfa	331..393
SS 1-scFv	400..1119
GS-enlazador	1126..1155
Secuencia derivada de NKp46	1156..1365

Secuencia

ATGATTCCAG CAGTGGTCTT GCTCTTACTC CTTTTGGTTG AACAAAGCAGC GGCCTGGGA
 GAGCCTCAGC TCTGCTATAT CCTGGATGCC ATCCTGTTTC TGTATGGAAT TGTCTCACC
 CTCCTCTACT GCCACTGAA GATCCAAGTG CGAAAGGCAG CTATAACCAG CTATGAGAAA
 TCAGATGGTG TTTACACGGG CCTGAGCACC AGGAACCAGG AGACTTACGA GACTCTGAAG
 CATGAGAAAC CACCACAGT CGGAGGCGGC GGAGAGGGCA GAGGAAGTCT TCTAACATGC
 GGTGACGTGG AGGAGAAATCC CGGCCCTAGG ATGGCCTTAC CAGTGACCGC CTTGCTCCTG
 CCGCTGGCCT TGCTGCTCCA CGCCGCCAGG CCGGGATCCC AGGTACAACCT GCAGCAGTCT
 GGGCCTGAGC TGGAGAAGCC TGGCGCTTCA GTGAAGATAT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAC
 TCATTCCTG GCTACACCAT GAACTGGGTG AAGCAGAGCC ATGGAAAGAG CCTTGAGTGG
 ATTGGACTTA TTA CTCTTA CAATGGTGCT TCTAGCTACA ACCAGAAGTT CAGGGGCAAG
 GCCACATTA CTGTAGACAA GTCATCCAGC ACAGCCTACA TGGACCTCCT CAGTCTGACA
 TCTGAAGACT CTGCAGTCTA TTTCTGTGCA AGGGGGGGTT ACGACGGGAG GGGTTTTGAC
 TACTGGGGCC AAGGGACCAC GGTCACCGTC TCCTCAGGTG GAGGCGGTTC AGGCGGCGGT
 GGCTCTAGCG GTGGTGGATC GGACATCGAG CTCACTCAGT CTCCAGCAAT CATGTCTGCA
 TCTCCAGGGG AGAAGGTCAC CATGACCTGC AGTGCCAGCT CAAGTGTAAG TTACATGCAC
 TGGTACCAGC AGAAGTCAGG CACCTCCCC AAAAGATGGA TTTATGACAC ATCCAAACTG
 GCTTCTGGAG TCCCAGGTCG CTTCACTGGC AGTGGGTCTG GAAACTCTTA CTCTCTACA
 ATCAGCAGCG TGGAGGCTGA AGATGATGCA ACTTATTACT GCCAGCAGTG GAGTAAGCAC
 CCTCTCACGT ACGGTGCTGG GACAAAGTTG GAAATCAAAG CTAGCGGTGG CGGAGGTTCT
 GGAGGTGGGG GTTCTTAAAC CACAGAGACG GGACTCCAGA AAGACCATGC CCTCTGGGAT
 CACACTGCCC AGAATCTCCT TCGGATGGG CTGGCCTTTC TAGTCCTGGT GGCTCTAGTG
 TGGTTCTGG TTGAAGACTG GCTCAGCAGG AAGAGGACTA GAGAGCGAGC CAGCAGAGCT
 10 TCCACTTGGG AAGGCAGGAG AAGGCTGAAC ACACAGACTC TTTGA

FCERG-T2A-SSI-TNKp46 (SEQ ID NO: 335)

455aa Proteína

CARACTERÍSTICAS	Ubicación
FCERG	1..86
T2A	91..109
Péptido señal de CD8alfa	111..131

(continuación)

CARACTERÍSTICAS	Ubicación
SS1-scFv	134..373
GS-enlazador	376..385
Secuencia derivada de NKp46	386..454

Secuencia

MIPAVVLLLL LLVEQAAAALG EPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV RKAITSYK
SDGVYTGSLT RNQETYEYTLK HEKPPQSGGG GEGRGSLLTC GDVEENPGPR MALPVTALL
PLALLLHAAR PGSVQLQQS GPELEKPGAS VKISCKASGY SFTGYTMNWV KQSHGKSLEW
IGLITPYNGA SSYNQKFRGK ATLTVDKSS TAYMDLSSLT SEDSAVYFCA RGGYDGRGFD
YWGQGTTVTV SSGGGGSGGG GSSGGGSDIE LTQSPAIMSA SPGEKVTMTC SASSSVSYMH
WYQQKSGTSP KRWIYDTSKL ASGVPGRFSG SGSGNSYSLT ISSVEAEDDA TYQCQWSKH
PLTYGAGTKL EIKASGGGGS GGGGLTET GLQKDHALWD HTAQNLLRMG LAFLVLVALV
WFLVEDWLSR KRTRERASRA STWEGRRRLN QTTL

- 5 A continuación se proporciona la secuencia de ácido nucleico y aminoácido de un NKR-CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD19 y un dominio citoplasmático KIRS2, así como una molécula adaptadora DAP12 unida a través del sitio de escisión del péptido T2A:

DAP12-T2A-CD19-KIRS2 (SEQ ID NO: 336) 1470 pb de ADN

CARACTERÍSTICAS	Ubicación
DAP12	1..339
Secuencia T2A	352..408
CD19-scFv	481.. 481
GS-enlazador	1213..1242
Secuencia derivada de KIR2DS2	1243..1470

10 Secuencia

ATGGGGGGAC TTGAACCTG CAGCAGGTTCT CTGCTCCTGC CTCTCCTGCT GGCTGTAAGT
GGTCTCCGTC CTGTCCAGGT CCAGGCCAG AGCGATTGCA GTTGCTCTAC GGTGAGCCCG
GGCGTGCTGG CAGGGATCGT GATGGGAGAC CTGGTGCTGA CAGTGCTCAT TGCCCTGGCC
GTGTACTTCC TGGGCCGGCT GGTCCCTCGG GGGCGAGGGG CTGCGGAGGC AGCGACCCGG
AAACAGCGTA TACTGAGAC CGAGTCGCT TATCAGGAGC TCCAGGGTCA GAGGTCGGAT
GTCTACAGCG ACCTCAACAC ACAGAGGCCG TATTACAAAG TCGAGGGCGG CGGAGAGGGG
AGAGGAAGTC TTCTAACATC CGGTGACGTG GAGGAGAATC CCGGCCCTAG GATGGCCTTA
CCAGTGACCG CCTTGCTCCT GCCGCTGGCC TTGCTGCTCC ACGCCGCCAG GCCGGGATCC
GACATCCAGA TGACACAGAC TACATCCTCC CTGTCTGCCT CTCTGGGAGA CAGAGTCACC
ATCAGTTGCA GGGCAAGTCA GGACATTAGT AAATATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GATGGAACCTG TAAACTCCT GATCTACCAT ACATCAAGAT TACTACTCAGG AGTCCCATCA
AGGTTCAAGT GCAGTGGGTC TGGAACAGAT TATTCTCTCA CCATTAGCAA CCTGGAGCAA
GAAGATATTG CCACTTACTT TTGCCAACAG GGTAATACGC TTCCGTACAC GTTCGGAGGG
GGGACTAAGT TGGAAATAAC AGGTGGCGGT GGCTCGGGCG GTGGTGGGTC GGGTGGCGGC
GGATCTGAGG TGAACCTGCA GGAGTCAGGA CCTGGCCTGG TGGCGCCCTC ACAGAGCCTG
TCCGTACAT GCACTGTCTC AGGGGTCTCA TTACCCGACT ATGGTGTAAAG CTGGATTGCG
CAGCCTCCAC GAAAGGGTCT GGAGTGGCTG GGAGTAATAT GGGGTAGTGA AACCACATAC
TATAATTGAG CTCTCAAATC CAGACTGACC ATCATCAAGG ACAACTCAA GAGCCAAGTT
TTCTAAAAA TGAACAGTCT GCAAAGTAT GACACAGCCA TTTACTACTG TGCCAAACAT
TATTACTACG GTGGTAGCTA TGCTATGGAC TACTGGGGTC AAGGAACCTC AGTCACCGTC
TCCTCAGCTA GCGGTGGCGG AGGTTCTGGA GGTGGGGGTT CCTCACCCAC TGAACCAAGC
TCCAAAACCG GTAACCCAG ACACCTGCAT GTTCTGATTG GGACCTCAGT GGTCAAAATC
CCTTTCACCA TCCTCCTCTT CTTTCTCCT CATCGCTGGT GCTCCAACAA AAAAAATGCT
GCTGTAATGG ACCAAGAGCC TGCAGGGAAC AGAACAGTGA ACAGCGAGGA TTCTGATGAA
CAAGACCATC AGGAGGTGTC ATACGCATAA

DAP12-T2A-CD19-KIRS2 (SEQ ID NO: 337)

489 aa Proteína

CARACTERÍSTICAS	Ubicación
DAP12	1..113
Secuencia T2A	118..136
Péptido_ señal de CD8alfa	138..158
CD19-scFv	161.. 402
GS-enlazador	405..414
Secuencia derivada de KIR2DS2	415..489

Secuencia

MĠGLEPCSRF LLLPLLLAVS GLRPVQVQAQ SDCSCSTVSP GVLGIVMGD LVLTVLIALA
 VYFLGRLVPR GRGAAEAATR KQRITETESP YQELQGQRSD VYSDLNTQRP YYKVEGGEG
 RGSLLTCGDV EENPGPRMAL PVTALLLPLA LLLHAARPGS DIQMTQTTSS LSASLGDRVT
 ISCRASQDIS KYLNWYQQKP DGTVKLLIYH TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ
 EDIATYFCQQ GNTLPYTFGG GTKLEITGGG GSGGGGSGGG GSEVKLQESG PGLVAPSQSL
 SVTCTVSGVS LPDYGVSWIR QPPRKGLEWL GVIWGSETTY YNSALKSRLT IIKDNSKSQV
 FLKMNSLQTD DTAIYYCAKH YYYGGSYAMD YWGQTSVTV SSASGGGGSG GGGSSPTEPS
 SKTGNPRHLH VLIGHTSVVKI PFTILLFFLL HRWCSNKKNA AVMDQEPAGN RTVNSEDSDE
 QDHQEVSYA*

5 El dominio transmembrana es un dominio transmembrana KIR2DS2. La secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana de KIR2DS2 es la siguiente:

VLIGHTSVKIPFTILLFFLL (SEQ ID NO: 357)

La secuencia de aminoácidos de un dominio transmembrana de KIR2DL3 es la siguiente:

VLIGHTSVVILFILLFFLL (SEQ ID NO: 358)

La secuencia de aminoácidos de un dominio transmembrana NKp46 es la siguiente:

10 LLRMGLAFLVLVALVWFLVEDWLS (SEQ ID NO: 359)

El dominio citoplásmico se deriva de KIR2DS2, por ejemplo, un KIRS2DS2 natural como se muestra en la Figura 29. La secuencia de aminoácidos de un dominio citoplásmico derivado de KIR2DS2, también denominado en el presente documento dominio KIRS2, es la siguiente:

HRWCSNKKNAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA (SEQ ID NO: 360)

15 La secuencia de aminoácidos de un dominio citoplásmico derivado de KIR2DL3, también referido en el presente documento como dominio KIRL3, es la siguiente:

HRWCCNKKNAVMDQEPAGNRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLNHCVFTQRKITHPSQRPKTPPTDIIVYTE
 LPNAEP (SEQ ID NO: 361)

La secuencia de aminoácidos de un dominio citoplásmico derivado de NKp46, también denominado en el presente documento como dominio tNKp46 o TNKp46, es la siguiente:

20 RKRTREASRASTWEGRRRLNTQTL (SEQ ID NO: 362)

Como se describe en el presente documento, el dominio transmembrana y el citoplásmico, colectivamente, comprenden la secuencia de aminoácidos proporcionada a continuación:

VLIGHTSVVKIPFTILLFFLLHRWCSNKKNAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA (SEQ ID NO: 371)

25 Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido para un KIR-CAR que comprende un dominio de unión a antígeno humano que se une a la mesotelina también se proporcionan en este documento. Por ejemplo, a continuación se proporciona la secuencia de ácido nucleico de un KIR-CAR que comprende una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno específico de mesotelina humana M5 y un dominio citoplásmico KIRS2. La secuencia subrayada designa la secuencia del scFv M5, que puede intercambiarse fácilmente con cualquier otro dominio de unión a antígeno, por ejemplo, el scFv anti-mesotelina humano, descrito en el presente documento.

Atggccttaccagtgaccgccttgcctcctgcgcgtggccttgcctgctccacgcgcgccaggccgggatccc
aagtccaactcgttcaatcaggcgcagaagtcgaaaagcccggagcatcagtcgaaagtctcttgcaaggc
ttccggctacaccttcacggactactacatgcactgggtgcgccaggctccaggccagggactggagtg
atgggatggatcaaccggaattccgggggaactaactacgccagaagtttcaggccgggtgactatga
ctcgcgataacctcgatctcgactgcgtacatggagctcagccgcctccggctcggacgataccgccgtgta
ctattgtgcgtcgggatgggacttcgactactgggggagggcactctggctcactgtgtcaagcgggagga
ggtggatcaggctggaggtggaagcgggggaggggttccggcggcggaggatcagatatcgtgatgcgc
aatgccttccctcgttgcctccatccgtgggagacagggtgaccattacttgagagcgtcccagtcctat
tccgtactacctgctggtaccagcagaagccgggggaaagcccaaaaactgcttatctatactgcctcg
atcctccaaaacggcgtgccatcaagatcagcgggttcgggcagcgggaccgactttaccctgactatca
gcagcctgcagccggaagatttccgccactactgcctgcaaacctacaccaccccgacttcggacc
tggaaaccaagtgagatcaaggctagcgggtggcggaggttctggaggtgggggttctcaccactgaa
ccaagctccaaaaccggaacccagacacctgcatggttctgattgggacctcagtggtcaaaaatccctt
tcaccatctcctctcttctctccttcacgcgtgggtgctccaacaaaaaaatgctgctgtaatggacca
agagcctcagggaaacagaacagtgaaacagcagaggttctgatgaacaagaccatcaggaggtgtcatac
gcataa
 (SEQ ID NO: 363)

5 La secuencia de aminoácidos del KIR-CAR que comprende una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno M5 específico de la mesotelina humana y un dominio citoplasmático KIRS2 se proporciona a continuación. La secuencia subrayada designa la secuencia del scFv M5, que puede intercambiarse fácilmente con cualquier otro dominio de unión a antígeno, por ejemplo, el scFv anti-mesotelina humano, descrito en el presente documento.

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHWVRQAPGQGLEW
MGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISLAYMELSLRLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGLTVTVSSGG
GGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIIRYYLSWYQQKPKAPKLLIYTAS
ILQNGVPSRFGSGSGDFTLTISLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKASGGGGSGGGSSPTE
PSSKTGNPRHLHLVLIIGTSVVKIPFTILLFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSY
 A
 (SEQ ID NO: 364)

10 En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de un KIR-CAR multicadena que comprende una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno específico de mesotelina humana M5, y un dominio citoplasmático KIRS2, y que además comprende un sitio de corte de péptido y una secuencia de molécula adaptadora DAP12, se proporciona a continuación. La secuencia subrayada designa la secuencia del scFv M5, que puede intercambiarse fácilmente con cualquier otro dominio de unión a antígeno, por ejemplo, el scFv anti-mesotelina humano, descrito en el presente documento. La secuencia en **negrita** designa la secuencia DAP12 y la secuencia en *cursiva* designa el sitio de corte del péptido T2A

ATGGGGGACTTGAACCTGCAGCAGGTTCTCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTC
CTGTCCAGGTCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCCGGCGTGCTGGCAGGGATCGT
GATGGGAGACCTGGTGTGACAGTGCATTCGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGG
GGCGGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGC
TCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAAT *ccggaggcag*
cggagagggcagaggaagtcttctaacaatgcgggtgacgtggaggagaatcccggccTAGGatggcctta
ccagtgaccgccttgcctcctgcgcgtggccttgcctgctccacgcgcgccaggccggGATCCcaagtccaac
tcgttcaatcaggcgcagaagtcgaaaagcccggagcatcagtcgaaagtctcttgcaaggcttccggcta
caccttcacggactactacatgcactgggtgcgccaggctccaggccagggactggagtgatgggatggatgg
atcaaccggaattccgggggaactaactacgccagaagtttcaggccgggtgactatgactcgcgata
cctcgatctcgactgcgtacatggagctcagccgcctccggctcggacgataccgccgtgactattgtgc
gtcgggatgggacttcgactactggggcagggcactctggctcactgtgtcaagcggaggaggtggatca
ggtggaggtggaagcgggggagggaggttccggcggcggaggatcagatatcgtgatgacgcaatgcctt
cctcgttgcctccatccgtgggagacagggtgaccattacttgagagcgtcccagtcattcggtaacta
cctgtcgtggtaccagcagaagccgggggaaagcccaaaaactgcttatctatactgcctcgatcctccaa
aacggcgtgccatcaagattcagcgggttcgggcagcgggaccgactttaccctgactatcagcagcctca
agccggaagatttcgccacgtactactgcctgcaaacctacaccaccccgacttcggacctggaaccaa
ggtagagatcaagGctagcgggtggcggaggttctggaggtgggggtcctcaccactgaaccaagctcc
aaaaccggtaacccagacacctgcatGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCAAAATCCCTTTCACCATCC
TCCTCTTCTTCTCCTTcatcgcgtgggtgctccaacaaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgc
agggaaacagaacagtgaaacagcagaggttctgatgaacaagaccatcaggaggtgtcatacgcataa
 (SEQ ID NO: 365)

15 La secuencia de aminoácidos del KIR-CAR multicadena que comprende una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno específico de mesotelina humana M5 y un dominio citoplasmático KIRS2, y que además comprende un sitio de corte de péptido y una secuencia de molécula adaptadora DAP12, se proporciona a continuación. La secuencia subrayada designa la secuencia del scFv M5, que puede intercambiarse fácilmente con cualquier otro dominio de

unión a antígeno, por ejemplo, el scFv anti-mesotelina humano, descrito en el presente documento. La secuencia en negrita designa la secuencia DAP12 y la secuencia en cursiva designa el sitio de corte del péptido T2A

MGGLEPCSRFLLLP~~LL~~LLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLT~~V~~LIALAVYFLGR~~L~~VPR
GRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGRSDVYSDLNTQRPYKSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMAL
 PVTALLLP~~L~~LALLLHAARPGSQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSKASGYTFTDYMHWVRQAPGQGLEW~~M~~GW
INPNSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR~~L~~RSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGT~~L~~VTVSSGGGGG
GGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSLSASVGD~~R~~VTTITCRASQSI~~R~~YYLSWYQQKPKAPK~~L~~LIYTASILQ
NGVPSRFSGSGSTDFTLTIS~~S~~LQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKASGGGGSGGGSSPTEPSS
 KTG~~N~~PRHLHVLIGTSVVKIPFTILLFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA
 (SEQ ID NO: 366)

DOMINIO CITOPASMÁTICO

5 El dominio citoplasmático de un CAR descrito en el presente documento, por ejemplo, un NKR-CAR o un TCAR, incluye un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular es capaz de activar al menos una de las funciones efectoras normales de la célula efectora inmunitaria en la que se ha introducido el CAR.

10 Los ejemplos de dominios de señalización intracelular para su uso en el CAR de la divulgación incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de células T (TCR) y los correceptores que actúan de forma concertada para iniciar la transducción de señales tras el acoplamiento del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia recombinante que tenga la misma capacidad funcional.

15 Se sabe que las señales generadas a través del TCR por sí solas son insuficientes para la activación completa de la célula efectora inmune, por ejemplo, la célula T o la célula NK, y que también se requiere una señal secundaria y/o coestimuladora. Así, puede decirse que la activación de las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, la activación de las células T o la activación de las células NK, está mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (dominios de señalización intracelular primaria) y las que actúan de forma independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (dominio citoplasmático secundario, por ejemplo, un dominio coestimulador).

Dominio primario de señalización intracelular

20 Como se describe en el presente documento, un dominio primario de señalización intracelular produce una señal intracelular cuando un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, al que está fusionado se une al antígeno conocido. Se deriva de una molécula estimuladora primaria, por ejemplo, comprende la secuencia intracelular de una molécula estimuladora primaria. Comprende una secuencia de molécula estimuladora primaria suficiente para producir una señal intracelular, por ejemplo, cuando un dominio de unión a antígeno al que está fusionado se une a un antígeno afín.

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

35 La estimulación primaria puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, como la regulación a la baja del TGF-β, y/o la reorganización de las estructuras citoesqueléticas, y similares. La estimulación puede, por ejemplo, en presencia de la coestimulación, dar lugar a una optimización, por ejemplo, un aumento, de una función inmunitaria efectora de la célula T. La estimulación, por ejemplo, en el contexto de una célula T, puede mediar una respuesta de la célula T, por ejemplo, proliferación, activación, diferenciación y similares.

40 Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización intracelular primario comprende un motivo de señalización, por ejemplo, un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora o ITAM. Un dominio de señalización intracelular primario puede comprender ITAM que contenga secuencias de señalización citoplasmática de TCR zeta (CD3 zeta), FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (también conocido como "ICOS"), FcεRI, DAP10, DAP12 y CD66d.

En la Tabla 2 se proporcionan ejemplos de dominios primarios de señalización intracelular que contienen ITAM.

45

Tabla 2: Dominios primarios de señalización intracelular (por ejemplo, dominios que contienen ITAM)	
CD3 zeta	CD5
FcR gamma	CD22
FcR beta	CD278 ("ICOS")
CD3 gamma	Fc épsilon RI (FcεRI)
CD3 delta	CD66d
CD3 épsilon	DAP10
CD79a	DAP12
CD79b	

Como se describe en el presente documento, un dominio de señalización intracelular primario comprende un dominio ITAM modificado, por ejemplo, un dominio ITAM mutado que tiene una actividad alterada (por ejemplo, aumentada o disminuida) en comparación con el dominio ITAM nativo. Como se describe en el presente documento, un dominio de señalización intracelular primario comprende un dominio de señalización intracelular primario que contiene ITAM modificado, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primario que contiene ITAM optimizado y/o truncado. Como se describe en el presente documento, un dominio de señalización intracelular primario comprende uno, dos, tres, cuatro o más motivos ITAM.

Un dominio de señalización intracelular primario comprende un fragmento funcional, o análogo, de una molécula estimuladora primaria (por ejemplo, CD3 zeta - N° de Ac. del GenBank BAG36664.1). Puede comprender toda la región intracelular o un fragmento de la región intracelular que sea suficiente para generar una señal intracelular cuando un dominio de unión a antígeno al que está fusionado, o acoplado por un conmutador de dimerización, se une al antígeno conocido. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización intracelular primario tiene al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia con una molécula estimuladora primaria natural, por ejemplo una molécula estimuladora primaria divulgada en la Tabla 2, por ejemplo, una molécula estimuladora primaria humana (GenBank Acc. No. BAG36664.1), o de otro mamífero, por ejemplo, de una especie no humana, por ejemplo, roedores, monos, simios o murinos. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización intracelular primario tiene al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10.

Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización intracelular primario, tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 % de identidad con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de los residuos correspondientes de una molécula estimuladora primaria humana natural, por ejemplo, una molécula estimuladora primaria humana natural divulgada en el presente documento.

El dominio de señalización intracelular del TCAR puede comprender un dominio de señalización intracelular primario, por ejemplo, el dominio de señalización CD3-zeta, por sí mismo o puede combinarse con cualquier otro(s) dominio(s) de señalización intracelular deseado(s) útil(es) en el contexto del TCAR. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular del TCAR puede comprender un dominio de señalización intracelular primario, por ejemplo, la porción de cadena zeta de CD3, y uno o más dominios de señalización coestimuladora. A continuación se ofrecen ejemplos de domanis de señalización coestimuladora.

30 Dominio de señalización coestimuladora

Como se describe en el presente documento, un dominio de señalización coestimuladora produce una señal intracelular cuando un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno al que está fusionado, o acoplado por un conmutador de dimerización, se une al ligando conocido. Se deriva de una molécula coestimuladora. Comprende una secuencia de molécula coestimuladora primaria suficiente para producir una señal intracelular, por ejemplo, cuando un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, al que está fusionado, o acoplado por un conmutador de dimerización, se une al ligando conocido.

Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular, distintas de los receptores de antígenos o sus contraligandos, que promueven una respuesta inmunitaria efectora. En algunos casos son necesarios para una respuesta inmunitaria eficaz o mejorada. Típicamente, una molécula coestimuladora genera una señal intracelular que depende de la unión a un ligando afín que es, en las realizaciones, distinto de un antígeno, por ejemplo, el antígeno reconocido por un dominio de unión a antígeno de una célula T. Normalmente, la señalización de una molécula estimuladora primaria y de una molécula coestimuladora contribuyen a una respuesta inmunitaria efectora y, en algunos casos, ambas son necesarias para la generación eficiente o mejorada de una respuesta inmunitaria efectora.

Un dominio de señalización costimuladora comprende un fragmento funcional, o análogo, de una molécula costimuladora (por ejemplo, 4-1BB, CD28, CD27 e ICOS). Puede comprender toda la región intracelular o un fragmento

de la región intracelular de una molécula coestimuladora que sea suficiente para generar una señal intracelular, por ejemplo, cuando un dominio de unión a antígeno al que está fusionado, o acoplado por un conmutador de dimerización, se une al antígeno conocido. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización coestimuladora tiene al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia con una molécula coestimuladora natural descrita en el presente documento, por ejemplo, una molécula coestimuladora intracelular humana o de otro mamífero, por ejemplo, de una especie no humana, por ejemplo, roedor, mono, simio o murino. Como se describe en el presente documento, el dominio coestimulador tiene al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, o la SEQ ID NO: 38.

En la Tabla 3 se proporcionan ejemplos de dominios de señalización coestimuladora (dominios de señalización intracelular).

Tabla 3: Dominios de señalización coestimuladora (identificados por las moléculas coestimuladoras de las que derivan)

CD27	Molécula MHC clase I	SLAMF7	ITGA4	CD11c
CD28	Proteína del receptor del TNF	NKp80 (KLRF1)	IA4	ITGB1
4-1BB (CD137)	Proteína similar a la inmunoglobulina	NKp44	CD49D	CD29
OX40	Receptor de citoquinas	NKp30	ITGA6	ITGB2
CD30	Integrina	NKp46	VLA-6	CD18
CD40	Molécula de activación linfocítica de señalización (proteína SLAM)	CD19	CD49f	ITGB7
ICOS (CD278)	Activación de los receptores de las células NK	CD4	ITGAD	NKG2D
ICAM-1	Receptor del ligando Toll	CD8 alfa	CD11d	TNFR2
LFA-1 (CD11a/ CD18)	BTLA	CD8 beta	ITGAE	TRANCE/ RANKL
CD2	CDS	IL2R beta	CD103	DNAM1 (CD226)
CD7	ICAM-1	IL2R gamma	ITGAL	SLAMF4 (CD244, 2B4)
LIGHT	GITR	IL7R alfa	CD11a	CD84
NKG2C	BAFFR	ITGA4	ITGAM	CD96 (táctil)
B7-H3	HVEM (LIGHTR)	VLA1	CD11b	CEACAM1
un ligando que se une específicamente a CD83	KIRDS2	CD49a	ITGAX	CRTAM
Ly9 (CD229)	CD160 (BY55)	PSGL1	CD100 (SEMA4D)	CD69
SLAMF6 (NTB-A, Ly108)	SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3)	BLAME (SLAMF8)	SELPLG (CD 162)	LTBR
LAT	GADS	SLP-76	PAG/Cbp	CD19a

Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización coestimuladora, tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 % de identidad con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de los residuos correspondientes de una molécula estimuladora primaria humana de origen natural, por ejemplo, una molécula coestimuladora humana de origen natural divulgada en el presente documento, por ejemplo, proporcionada en la Tabla 3.

Las secuencias de señalización intracelular dentro del dominio citoplásmico del TCAR pueden estar unidas entre sí en un orden aleatorio o específico. Opcionalmente, un enlazador oligo o polipeptídico corto, por ejemplo, entre 2 y 10 aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos) de longitud puede formar el enlace entre las secuencias de señalización intracelular. Como se describe en el presente documento, puede utilizarse un doblete de glicina-serina como enlazador adecuado. Como se describe en el presente documento, un solo aminoácido, por ejemplo, una alanina, una glicina, puede utilizarse como un enlazador adecuado.

5 Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más, dominios de señalización coestimuladora. Como se describe en el presente documento, los dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más, dominios de señalización costimulatoria, están separados por una molécula de enlace, por ejemplo, una molécula de enlace descrita en el presente documento. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización intracelular comprende dos dominios de señalización coestimuladora. Como se describe en el presente documento, la molécula enlazadora es un residuo de glicina. Como se describe en el presente documento, el enlazador es un residuo de alanina.

10 Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de 4-1BB es un dominio de señalización que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de 4-1BB está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 18. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 (CD3-zeta mutante) o la SEQ ID NO: 10 (CD3-zeta humano de tipo salvaje).

15 Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD27. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de CD27 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de CD27 está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 19. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 (CD3-zeta mutante) o la SEQ ID NO: 10 (CD3-zeta humano de tipo salvaje).

20 Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de CD28 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. En un aspecto, el dominio de señalización de CD28 está codificado por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 37. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 (CD3-zeta mutante) o la SEQ ID NO: 10 (CD3-zeta humano de tipo salvaje).

25 Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de ICOS. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de ICOS comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de ICOS está codificado por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:39. Como se describe en el presente documento, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 (CD3-zeta mutante) o la SEQ ID NO: 10 (CD3-zeta humano de tipo salvaje).

DOMINIO TRANSMEMBRANA

30 Con respecto al dominio transmembrana, en varias realizaciones, un CAR puede ser diseñado para comprender un dominio transmembrana que está unido al dominio extracelular del CAR. Como se ha descrito anteriormente, el dominio transmembrana de un NKR-CAR descrito en el presente documento puede ser un dominio transmembrana de un NKR, por ejemplo, un dominio transmembrana KIR, un dominio transmembrana NCR, un dominio transmembrana SLAMF, un dominio transmembrana FcR, por ejemplo, un dominio transmembrana CD16 o un dominio transmembrana CD64, o un dominio transmembrana Ly49. Alternativamente, el dominio transmembrana de un NKR-CAR o un TCAR descrito en el presente documento puede ser cualquiera de los dominios transmembrana descritos a continuación.

35 El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o recombinante. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína de membrana o transmembrana. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de señalar al (los) dominio(s) intracelular(es) siempre que el CAR se haya unido a una diana. Un dominio transmembrana de uso particular en esta divulgación puede incluir al menos la(s) región(es) transmembrana de, por ejemplo, la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8 (por ejemplo, CD8 alfa, CD8 beta), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Como se describe en el presente documento, un dominio transmembrana puede incluir al menos la(s) región(es) transmembrana de, por ejemplo KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C y CD19.

40 Un dominio transmembrana puede incluir uno o más aminoácidos adicionales adyacentes a la región transmembrana, por ejemplo, uno o más aminoácidos asociados con la región extracelular de la proteína de la que se derivó la

transmembrana (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y/o uno o más aminoácidos adicionales asociados a la región intracelular de la proteína de la que deriva la transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). Tal y como se describe en el presente documento, el dominio transmembrana es el que se asocia a uno de los otros dominios de la CAR se utiliza.

5 En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse mediante la sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie, por ejemplo, para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. Como se describe en el presente documento, el dominio transmembrana es capaz de homodimerizarse con otro CAR en la superficie celular que expresa el CAR, por ejemplo, la célula CART. Como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana puede modificarse o sustituirse para minimizar las interacciones con los dominios de unión del compañero de unión nativo presente en la misma célula que expresa el CAR, por ejemplo, la célula CART.

15 En algunos casos, el dominio transmembrana puede estar unido a la región extracelular del CAR, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno del CAR, a través de una bisagra, por ejemplo, una bisagra de una proteína humana. Por ejemplo, en una realización, la bisagra puede ser una bisagra de Ig (inmunoglobulina) humana, por ejemplo, una bisagra IgG4, o una bisagra CD8a. Como se describe en el presente documento, la bisagra o espaciador comprende (por ejemplo, consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. Como se describe en el presente documento, el dominio transmembrana comprende (por ejemplo, consiste en) un dominio transmembrana de la SEQ ID NO: 6.

20 Como se describe en el presente documento, la bisagra o espaciador comprende una bisagra IgG4. Por ejemplo, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3. Como se describe en el presente documento, la bisagra o espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:14.

25 Como se describe en el presente documento, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de IgD. Por ejemplo, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4. Como se describe en el presente documento, la bisagra o espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15.

30 Como se describe en el presente documento, el dominio transmembrana puede ser recombinante, en cuyo caso comprenderá residuos predominantemente hidrófobos como la leucina y la valina. Como se describe en el presente documento, un triplete de fenilalanina, triptófano y valina puede encontrarse en cada extremo de un dominio transmembrana recombinante.

35 Opcionalmente, un oligo o polipéptido enlazador corto, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y la región citoplasmática del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador especialmente adecuado. Por ejemplo, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5. Como se describe en el presente documento, el enlazador está codificado por una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:16.

En un aspecto, la bisagra o espaciador comprende una bisagra KIR2DS2.

TCR QUIMÉRICO

40 Como se describe en el presente documento, un dominio de unión a antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento, por ejemplo, como se proporciona en la Tabla 4, puede injertarse en uno o más dominios constantes de una cadena de receptor de células T ("TCR"), por ejemplo, una cadena TCR alfa o TCR beta, para crear un TCR quimérico que se une de forma específica a un antígeno tumoral deseado. Sin estar limitado por la teoría, se cree que los TCRs quiméricos señalarán a través del complejo TCR al unirse al antígeno. Tales TCRs quiméricos pueden ser producidos por procedimientos conocidos en la técnica (Por ejemplo, Willemsen RA et al, Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377 Zhang T et al, Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496 Aggen et al, Gene Ther. 2012 Abr;19(4):365-74).

50 Como se describe en el presente documento, una célula que expresa NKR-CAR descrita en el presente documento, por ejemplo, una célula que expresa KIR-CAR descrita en el presente documento, comprende además un TCR quimérico. Alternativamente, una célula que expresa NKR-CAR descrita en el presente documento se administra en combinación con una célula que expresa un TCR quimérico. En tales casos, el dominio de unión a antígeno del TCR quimérico puede unirse al mismo antígeno tumoral que el NKR-CAR descrito en el presente documento, por ejemplo, KIR-CAR, o puede unirse a un antígeno tumoral diferente que el NKR-CAR descrito en el presente documento, por ejemplo, KIR-CAR.

CAR DIVIDIDO

55 Como se describe en el presente documento, la célula que expresa CAR utiliza un CAR dividido. El enfoque CAR dividido se describe con más detalle en las publicaciones WO2014/055442 y WO2014/055657. En resumen, un sistema CAR dividido comprende una célula que expresa un primer CAR que tiene un primer dominio de unión a

antígeno y un dominio coestimulador (por ejemplo, 4-1BB), y la célula también expresa un segundo CAR que tiene un segundo dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo, CD3 zeta). Cuando la célula encuentra el primer antígeno, el dominio coestimulador se activa y la célula prolifera. Cuando la célula encuentra el segundo antígeno, el dominio de señalización intracelular se activa y comienza la actividad de eliminación de células. Así, la célula que expresa el CAR sólo se activa completamente en presencia de ambos antígenos. Como se describe en el presente documento, el primer dominio de unión a antígeno reconoce un antígeno tumoral descrito en el presente documento, y el segundo dominio de unión a antígeno reconoce un antígeno tumoral diferente descrito en el presente documento.

ESTRATEGIAS PARA REGULAR LOS RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS

Hay muchas formas de regular las actividades de los CAR. Como se describe en el presente documento, un CAR regulable en el que la actividad del CAR puede ser controlada es deseable para optimizar la seguridad y la eficacia de una terapia CAR. Por ejemplo, inducir la apoptosis utilizando, por ejemplo, una caspasa fusionada con un dominio de dimerización (véase, por ejemplo, Di et al., *N Engl. J. Med.* 2011 Nov. 3; 365(18):1673-1683), puede utilizarse como conmutador de seguridad en la terapia CAR de la presente divulgación. En otro ejemplo, las células que expresan CAR también pueden expresar una molécula de Caspasa-9 inducible (iCaspase-9) que, tras la administración de un fármaco dimerizador (por ejemplo, rimiducid, también llamado AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) o AP20187 (Ariad)), provoca la activación de la Caspasa-9 y la apoptosis de las células. La molécula de iCaspasa-9 contiene un dominio de unión al inductor químico de la dimerización (CID) que media la dimerización en presencia de un CID. Esto da lugar a un agotamiento inducible y selectivo de las células que expresan CAR. En algunos casos, la molécula de iCaspasa-9 está codificada por una molécula de ácido nucleico separada del vector o vectores de codificación de CAR. En algunos casos, la molécula de iCaspasa-9 está codificada por la misma molécula de ácido nucleico que el vector de codificación de CAR. La iCaspasa-9 puede proporcionar un conmutador de seguridad para evitar cualquier toxicidad de las células que expresan CAR. Véase, por ejemplo Song et al. *Cancer Gene Ther.* 2008; 15(10):667-75; *Clinical Trial Id. N° NCT02107963*; y Di Stasi et al. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365:1673-83.

Las estrategias alternativas para regular la terapia CAR de la presente divulgación incluyen la utilización de pequeñas moléculas o anticuerpos que desactivan o apagan la actividad CAR, por ejemplo, eliminando las células que expresan CAR, por ejemplo, induciendo la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un antígeno que es reconocido por moléculas capaces de inducir la muerte celular, por ejemplo, ADCC o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un receptor capaz de ser dirigido por un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Ejemplos de dichos receptores son EpCAM, VEGFR, integrinas (por ejemplo, integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha4$, $\alpha1\beta3$, $\alpha4\beta7$, $\alpha5\beta1$, $\alpha\nu\beta3$, $\alpha\nu$), miembros de la superfamilia de receptores del TNF (por ejemplo, TRAIL-R1, TRAIL-R2), receptor PDGF, receptor de interferón, receptor de folato, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, receptor de IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD11e, CD11f, CD11g, CD11h, CD11i, CD11j, CD11k, CD11l, CD11m, CD11n, CD11p, CD11q, CD11r, CD11s, CD11t, CD11u, CD11v, CD11w, CD11x, CD11y, CD11z, CD12, CD13, CD14, CD15, CD16, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60, CD61, CD62, CD63, CD64, CD65, CD66, CD67, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD76, CD77, CD78, CD79, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD121, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD128, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CD146, CD147, CD148, CD149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158, CD159, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172, CD173, CD174, CD175, CD176, CD177, CD178, CD179, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CD198, CD199, CD200, CD201, CD202, CD203, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CD211, CD212, CD213, CD214, CD215, CD216, CD217, CD218, CD219, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255, CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CD293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD341, CD342, CD343, CD344, CD345, CD346, CD347, CD348, CD349, CD350, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD356, CD357, CD358, CD359, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370, CD371, CD372, CD373, CD374, CD375, CD376, CD377, CD378, CD379, CD380, CD381, CD382, CD383, CD384, CD385, CD386, CD387, CD388, CD389, CD390, CD391, CD392, CD393, CD394, CD395, CD396, CD397, CD398, CD399, CD400, CD401, CD402, CD403, CD404, CD405, CD406, CD407, CD408, CD409, CD410, CD411, CD412, CD413, CD414, CD415, CD416, CD417, CD418, CD419, CD420, CD421, CD422, CD423, CD424, CD425, CD426, CD427, CD428, CD429, CD430, CD431, CD432, CD433, CD434, CD435, CD436, CD437, CD438, CD439, CD440, CD441, CD442, CD443, CD444, CD445, CD446, CD447, CD448, CD449, CD450, CD451, CD452, CD453, CD454, CD455, CD456, CD457, CD458, CD459, CD460, CD461, CD462, CD463, CD464, CD465, CD466, CD467, CD468, CD469, CD470, CD471, CD472, CD473, CD474, CD475, CD476, CD477, CD478, CD479, CD480, CD481, CD482, CD483, CD484, CD485, CD486, CD487, CD488, CD489, CD490, CD491, CD492, CD493, CD494, CD495, CD496, CD497, CD498, CD499, CD500, CD501, CD502, CD503, CD504, CD505, CD506, CD507, CD508, CD509, CD510, CD511, CD512, CD513, CD514, CD515, CD516, CD517, CD518, CD519, CD520, CD521, CD522, CD523, CD524, CD525, CD526, CD527, CD528, CD529, CD530, CD531, CD532, CD533, CD534, CD535, CD536, CD537, CD538, CD539, CD540, CD541, CD542, CD543, CD544, CD545, CD546, CD547, CD548, CD549, CD550, CD551, CD552, CD553, CD554, CD555, CD556, CD557, CD558, CD559, CD560, CD561, CD562, CD563, CD564, CD565, CD566, CD567, CD568, CD569, CD570, CD571, CD572, CD573, CD574, CD575, CD576, CD577, CD578, CD579, CD580, CD581, CD582, CD583, CD584, CD585, CD586, CD587, CD588, CD589, CD590, CD591, CD592, CD593, CD594, CD595, CD596, CD597, CD598, CD599, CD600, CD601, CD602, CD603, CD604, CD605, CD606, CD607, CD608, CD609, CD610, CD611, CD612, CD613, CD614, CD615, CD616, CD617, CD618, CD619, CD620, CD621, CD622, CD623, CD624, CD625, CD626, CD627, CD628, CD629, CD630, CD631, CD632, CD633, CD634, CD635, CD636, CD637, CD638, CD639, CD640, CD641, CD642, CD643, CD644, CD645, CD646, CD647, CD648, CD649, CD650, CD651, CD652, CD653, CD654, CD655, CD656, CD657, CD658, CD659, CD660, CD661, CD662, CD663, CD664, CD665, CD666, CD667, CD668, CD669, CD670, CD671, CD672, CD673, CD674, CD675, CD676, CD677, CD678, CD679, CD680, CD681, CD682, CD683, CD684, CD685, CD686, CD687, CD688, CD689, CD690, CD691, CD692, CD693, CD694, CD695, CD696, CD697, CD698, CD699, CD700, CD701, CD702, CD703, CD704, CD705, CD706, CD707, CD708, CD709, CD710, CD711, CD712, CD713, CD714, CD715, CD716, CD717, CD718, CD719, CD720, CD721, CD722, CD723, CD724, CD725, CD726, CD727, CD728, CD729, CD730, CD731, CD732, CD733, CD734, CD735, CD736, CD737, CD738, CD739, CD740, CD741, CD742, CD743, CD744, CD745, CD746, CD747, CD748, CD749, CD750, CD751, CD752, CD753, CD754, CD755, CD756, CD757, CD758, CD759, CD760, CD761, CD762, CD763, CD764, CD765, CD766, CD767, CD768, CD769, CD770, CD771, CD772, CD773, CD774, CD775, CD776, CD777, CD778, CD779, CD780, CD781, CD782, CD783, CD784, CD785, CD786, CD787, CD788, CD789, CD790, CD791, CD792, CD793, CD794, CD795, CD796, CD797, CD798, CD799, CD800, CD801, CD802, CD803, CD804, CD805, CD806, CD807, CD808, CD809, CD810, CD811, CD812, CD813, CD814, CD815, CD816, CD817, CD818, CD819, CD820, CD821, CD822, CD823, CD824, CD825, CD826, CD827, CD828, CD829, CD830, CD831, CD832, CD833, CD834, CD835, CD836, CD837, CD838, CD839, CD840, CD841, CD842, CD843, CD844, CD845, CD846, CD847, CD848, CD849, CD850, CD851, CD852, CD853, CD854, CD855, CD856, CD857, CD858, CD859, CD860, CD861, CD862, CD863, CD864, CD865, CD866, CD867, CD868, CD869, CD870, CD871, CD872, CD873, CD874, CD875, CD876, CD877, CD878, CD879, CD880, CD881, CD882, CD883, CD884, CD885, CD886, CD887, CD888, CD889, CD890, CD891, CD892, CD893, CD894, CD895, CD896, CD897, CD898, CD899, CD900, CD901, CD902, CD903, CD904, CD905, CD906, CD907, CD908, CD909, CD910, CD911, CD912, CD913, CD914, CD915, CD916, CD917, CD918, CD919, CD920, CD921, CD922, CD923, CD924, CD925, CD926, CD927, CD928, CD929, CD930, CD931, CD932, CD933, CD934, CD935, CD936, CD937, CD938, CD939, CD940, CD941, CD942, CD943, CD944, CD945, CD946, CD947, CD948, CD949, CD950, CD951, CD952, CD953, CD954, CD955, CD956, CD957, CD958, CD959, CD960, CD961, CD962, CD963, CD964, CD965, CD966, CD967, CD968, CD969, CD970, CD971, CD972, CD973, CD974, CD975, CD976, CD977, CD978, CD979, CD980, CD981, CD982, CD983, CD984, CD985, CD986, CD987, CD988, CD989, CD990, CD991, CD992, CD993, CD994, CD995, CD996, CD997, CD998, CD999, CD1000).

Por ejemplo, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento también puede expresar un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) truncado que carece de capacidad de señalización, pero que retiene el epítipo que es reconocido por moléculas capaces de inducir ADCC, por ejemplo, cetuximab (ERBITUX®), de manera que la administración de cetuximab induce ADCC y el subsiguiente agotamiento de las células que expresan CAR (véase, por ejemplo, WO2011/056894y Jonnalagadda et al., *Gene Ther.* 2013; 20(8)853-860). Otra estrategia incluye la expresión de un gen marcador/suicida altamente compacto que combina epítipos diana de los antígenos CD32 y CD20 en las células que expresan CAR descritas en el presente documento, que se une al rituximab, lo que resulta en el agotamiento selectivo de las células que expresan CAR, por ejemplo, por ADCC (véase, por ejemplo, Philip et al., *Blood.* 2014; 124(8)1277-1287). Otros procedimientos para agotar las células que expresan CAR descritos en el presente documento incluyen la administración de CAMPATH, un anticuerpo monoclonal anti-CD52 que se une selectivamente y se dirige a los linfocitos maduros, por ejemplo, a las células que expresan CAR, para su destrucción, por ejemplo, mediante la inducción de ADCC. En otros casos, la célula que expresa el CAR puede dirigirse selectivamente utilizando un ligando CAR, por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico. En algunos casos, el anticuerpo anti-idiotípico puede provocar la actividad de las células efectoras, por ejemplo, actividades ADCC o ADC, reduciendo así el número de células que expresan CAR. En otros casos, el ligando CAR, por ejemplo, el anticuerpo anti-idiotipo, puede acoplarse a un agente que induce la muerte de las células, por ejemplo, una toxina, reduciendo así el número de células que expresan CAR. Alternativamente, las propias moléculas CAR pueden configurarse de manera que la actividad pueda regularse, por ejemplo, encendiéndose y apagándose, como se describe a continuación.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento también puede expresar una proteína diana reconocida por el agente reductor de células T. Como se describe en el presente documento, la proteína diana es CD20 y el agente depletor de células T es un anticuerpo anti-CD20, por ejemplo, rituximab. En estos casos, el agente depletor de células T se administra una vez que se desea reducir o eliminar la célula que expresa el CAR, por ejemplo, para mitigar la toxicidad inducida por el CAR. En otros casos, el agente

depletor de células T es un anticuerpo anti-CD52, por ejemplo, alemtuzumab, como se describe en los Ejemplos del presente documento.

En otros casos, un CAR regulable (RCAR) comprende un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en los ejemplos más sencillos, en los que los componentes de un CAR estándar descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular, están repartidos en polipéptidos o miembros separados. En algunos casos, el conjunto de polipéptidos incluye un conmutador de dimerización que, en presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, por ejemplo, puede acoplar un dominio de unión a antígeno a un dominio de señalización intracelular. En el presente documento y en la Publicación internacional nº WO 2015/090229.

Como se describe en el presente documento, un RCAR comprende dos polipéptidos o miembros: 1) un miembro de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primario descrito en el presente documento, y un primer dominio de conmutación; 2) un miembro de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, que se une específicamente a un antígeno tumoral descrito en el presente documento, y un segundo dominio de conmutación. Opcionalmente, el RCAR comprende un dominio transmembrana descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, un dominio transmembrana puede estar dispuesto en el miembro de señalización intracelular, en el miembro de unión a antígeno, o en ambos. (A menos que se indique lo contrario, cuando se describen miembros o elementos de un RCAR, el orden puede ser el previsto, pero también se incluyen otros órdenes. Es decir, en un ejemplo, el orden es el establecido en el texto, pero en otros ejemplos, el orden puede ser diferente. Por ejemplo, el orden de los elementos en un lado de una región transmembrana puede ser diferente al del ejemplo, por ejemplo, la colocación de un dominio de conmutación en relación con un dominio de señalización intracelular puede ser diferente, por ejemplo, invertida).

Como se describe en el presente documento, el primer y el segundo dominio de conmutación pueden formar un conmutador de dimerización intracelular o extracelular. Como se describe en el presente documento, el conmutador de dimerización puede ser un conmutador de homodimerización, por ejemplo, en el que el primer y el segundo dominio de conmutador son el mismo, o un conmutador de heterodimerización, por ejemplo, en el que el primer y el segundo dominio de conmutador son diferentes entre sí.

Como se describe en el presente documento, un RCAR puede comprender un "conmutador múltiple" Un conmutador múltiple puede comprender dominios de conmutador de heterodimerización o dominios de conmutador de homodimerización. Un conmutador múltiple comprende una pluralidad de, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, dominios de conmutador, independientemente, en un primer miembro, por ejemplo, un miembro de unión a antígeno, y un segundo miembro, por ejemplo, un miembro de señalización intracelular. Como se describe en el presente documento, el primer miembro puede comprender una pluralidad de primeros dominios de conmutación, por ejemplo, dominios de conmutación basados en FKBP, y el segundo miembro puede comprender una pluralidad de segundos dominios de conmutación, por ejemplo, dominios de conmutación basados en FRB. Como se describe en el presente documento, el primer miembro puede comprender un primer y un segundo dominio de conmutación, por ejemplo, un dominio de conmutación basado en FKBP y un dominio de conmutación basado en FRB, y el segundo miembro puede comprender un primer y un segundo dominio de conmutación, por ejemplo, un dominio de conmutación basado en FKBP y un dominio de conmutación basado en FRB.

Como se describe en el presente documento, el miembro de señalización intracelular comprende uno o más dominios de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primario y uno o más dominios de señalización coestimuladora.

Como se describe en el presente documento, el miembro de unión a antígeno puede comprender uno o más dominios de señalización intracelular, por ejemplo, uno o más dominios de señalización coestimuladora. Como se describe en el presente documento, el miembro de unión a antígeno comprende una pluralidad, por ejemplo, 2 o 3 dominios de señalización costimuladora descritos en el presente documento, por ejemplo, seleccionados entre 4-1BB, CD28, CD27, ICOS y OX40, y opcionalmente, ningún dominio de señalización intracelular primario. Como se describe en el presente documento, el miembro de unión a antígeno comprende los siguientes dominios de señalización coestimuladora, desde la dirección extracelular a la intracelular: 4-1BB-CD27; 4-1BB-CD27; CD27-4-1BB; 4-1BB-CD28; CD28-4-1BB; OX40-CD28; CD28-OX40; CD28-4-1BB; o 4-1BB-CD28. En estos casos, el RCAR comprende (1) un miembro de unión a antígeno que comprende, un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, y dos dominios coestimuladores y un primer dominio de conmutación; y (2) un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio transmembrana o un dominio de sujeción a la membrana y al menos un dominio de señalización intracelular primario, y un segundo dominio de conmutación.

También se describen en el presente documento los RCAR en los que el miembro de unión al antígeno no está unido a la superficie de la célula CAR. Esto permite que una célula que tiene un miembro de señalización intracelular sea convenientemente emparejada con uno o más dominios de unión a antígeno, sin transformar la célula con una secuencia que codifique el miembro de unión a antígeno. En estos casos, el RCAR comprende: 1) un miembro de señalización intracelular que comprende: un primer dominio de conmutación, un dominio transmembrana, un dominio

de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primario, y un primer dominio de conmutación; y 2) un miembro de unión a antígenos que comprende: un dominio de unión a antígenos, y un segundo dominio de conmutación, en el que el miembro de unión a antígenos no comprende un dominio transmembrana o un dominio de sujeción a la membrana, y, opcionalmente, no comprende un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el RCAR puede comprender además 3) un segundo miembro de unión a antígeno que comprende: un segundo dominio de unión a antígeno, por ejemplo, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno diferente al unido por el dominio de unión a antígeno; y un segundo dominio de conmutación.

También se describen en el presente documento los RCAR en los que el miembro de unión al antígeno comprende una capacidad de activación y de focalización biespecífica. En este caso, el miembro de unión a antígeno puede comprender una pluralidad, por ejemplo, 2, 3, 4 o 5 dominios de unión a antígeno, por ejemplo, scFvs, en los que cada dominio de unión a antígeno se une a un antígeno diana, por ejemplo, diferentes antígenos o el mismo antígeno, por ejemplo, el mismo o diferentes epítomos en el mismo antígeno. En un caso, la pluralidad de dominios de unión a antígeno están en tándem, y opcionalmente, una región de enlace o bisagra está dispuesta entre cada uno de los dominios de unión a antígeno. En el presente documento se describen enlazadores y regiones de bisagra adecuados.

También se describen en el presente documento los RCAR que tienen una configuración que permite la conmutación de la proliferación. En este caso, el RCAR comprende: 1) un miembro de señalización intracelular que comprende: opcionalmente, un dominio transmembrana o un dominio de fijación a la membrana; uno o más dominios de señalización coestimuladores, por ejemplo, seleccionados entre 4-1BB, CD28, CD27, ICOS y OX40, y un dominio de conmutación; y 2) un miembro de unión a antígeno que comprende: un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular primario, por ejemplo, un dominio CD3zeta, en el que el miembro de unión a antígeno no comprende un dominio de conmutación, o no comprende un dominio de conmutación que dimerice con un dominio de conmutación en el miembro de señalización intracelular. En un caso, el miembro de unión a antígeno no comprende un dominio de señalización coestimulante. En un caso, el miembro de señalización intracelular comprende un dominio de conmutación de un conmutador de homodimerización. En un caso, el miembro de señalización intracelular comprende un primer dominio de conmutación de un conmutador de heterodimerización y el RCAR comprende un segundo miembro de señalización intracelular que comprende un segundo dominio de conmutación del conmutador de heterodimerización. En tales casos, el segundo miembro de señalización intracelular comprende los mismos dominios de señalización intracelular que el miembro de señalización intracelular. En un caso, el conmutador de dimerización es intracelular. En un caso, el conmutador de dimerización es extracelular.

En cualquiera de las configuraciones RCAR en el presente documento descritas, el primer y segundo dominios de conmutación comprenden un conmutador basado en FKBP-FRB como se describe en el presente documento.

También se describen en el presente documento células que comprenden un RCAR descrito en el presente documento. Cualquier célula diseñada para expresar un RCAR puede utilizarse como célula RCARX. En un caso, la célula RCARX es una célula T, y se denomina célula RCART. En un caso, la célula RCARX es una célula NK, y se denomina célula RCARN.

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

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

Interruptores de dimerización

Los conmutadores de dimerización pueden ser no covalentes o covalentes. En un conmutador de dimerización no covalente, la molécula de dimerización promueve una interacción no covalente entre los dominios del conmutador. En un conmutador de dimerización covalente, la molécula de dimerización promueve una interacción covalente entre los dominios del conmutador.

Como se describe en el presente documento, el RCAR comprende un conmutador de dimerización basado en FKBP/FRAP, o FKBP/FRB. La FKBP12 (FKBP, o proteína de unión a FK506) es una proteína citoplasmática abundante que sirve de diana intracelular inicial para el producto natural inmunosupresor, la rapamicina. La rapamicina se une a FKBP y al gran homólogo de PI3K FRAP (RAFT, mTOR). FRB es una porción de 93 aminoácidos de FRAP, que es suficiente para unir el complejo FKBP-rapamicina (Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J. & Schreiber, S. L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 4947-51.)

Como se describe en el presente documento, un conmutador basado en FKBP/FRAP, por ejemplo, un FKBP/FRB, puede utilizar una molécula de dimerización, por ejemplo, rapamicina o un análogo de rapamicina.

10 La secuencia de aminoácidos de la FKBP es la siguiente:

DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFPKR
GQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWE
EGVAQMSVVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVEL
LKLETSY (SEQ ID NO: 43)

Como se describe en el presente documento, un dominio de conmutación de FKBP puede comprender un fragmento de FKBP que tenga la capacidad de unirse con FRB, o un fragmento o análogo del mismo, en presencia de rapamicina o un rapálogo, por ejemplo, la porción subrayada de la SEQ ID NO: 43, que es

VQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSR
DRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVVGQRAKLTISPDYAY
15 GATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETS (SEQ ID NO:44)

La secuencia de aminoácidos de FRB es la siguiente:

ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER GPQTLKETSF
NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA WDLYYHVFRF ISK (SEQ ID NO: 45)

"Interruptor basado en FKBP/FRAP, por ejemplo, un FKBP/FRB", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a un conmutador de dimerización que comprende: un primer dominio de conmutador, que comprende un fragmento de FKBP o un análogo del mismo que tiene la capacidad de unirse con FRB, o un fragmento o análogo del mismo, en presencia de rapamicina o un rapálogo, por ejemplo, RAD001, y tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 % de identidad con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 residuos de aminoácidos de, la secuencia FKBP de la SEQ ID NO: 54 o 55; y un segundo dominio de conmutación, que comprende un fragmento de FRB o un análogo del mismo que tiene la capacidad de unirse con FRB, o un fragmento o un análogo del mismo, en presencia de rapamicina o un rapálogo, y que tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad con, o difiere en no más de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 residuos de aminoácidos de, la secuencia de FRB de la SEQ ID NO: 45. Un RCAR descrito en el presente documento comprende un dominio de conmutación que comprende residuos de aminoácidos divulgados en SEQ ID NO: 43 (o SEQ ID NO: 44), y un dominio de conmutación que comprende residuos de aminoácidos divulgados en SEQ ID NO: 45.

30 Como se describe en el presente documento, el conmutador de dimerización FKBP/FRB comprende un dominio de conmutador FRB modificado que exhibe una formación de complejo alterada, por ejemplo, mejorada, entre un dominio de conmutador basado en FRB, por ejemplo, el dominio de conmutador FRB modificado, un dominio de conmutador basado en FKBP, y la molécula de dimerización, por ejemplo, rapamicina o un rapálogo, por ejemplo, RAD001. Como se describe en el presente documento, el dominio de conmutación FRB modificado comprende una o más mutaciones, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, seleccionadas de entre las mutaciones en la(s) posición(es) de aminoácido L2031, E2032, S2035, R2036, F2039, G2040, T2098, W2101, D2102, Y2105 y F2108, donde el aminoácido de tipo salvaje está mutado a cualquier otro aminoácido de origen natural. Como se describe en el presente documento, un FRB mutante comprende una mutación en E2032, donde E2032 está mutado a fenilalanina (E2032F), metionina (E2032M), arginina (E2032R), valina (E2032V), tirosina (E2032Y), isoleucina (E2032I), por ejemplo, SEQ ID NO: 46, o leucina (E2032L), por ejemplo, SEQ ID NO: 47. Como se describe en el presente documento, un FRB mutante comprende una mutación en T2098, donde T2098 está mutado a fenilalanina (T2098F) o leucina (T2098L), por ejemplo, SEQ ID NO: 48. Como se describe en el presente documento, un FRB mutante comprende una mutación en E2032 y en T2098, donde E2032 está mutado a cualquier aminoácido, y donde T2098 está mutado a cualquier aminoácido, por ejemplo, SEQ ID NO: 49. Como se describe en el presente documento, un FRB mutante comprende una mutación E2032I y una T2098L, por ejemplo, SEQ ID NO: 50. Como se describe en el presente documento, un FRB mutante comprende una mutación E2032L y una T2098L, por ejemplo, SEQ ID NO: 51.

Tabla 6. Ejemplo de FRB mutante que tiene mayor afinidad por una molécula de dimerización.

Mutante FRB	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Mutante E2032I	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTL KETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI ISKTS	46
Mutante E2032L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTL KETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI ISKTS	47
Mutante T2098L	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTL KETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI ISKTS	48
E2032, T2098 mutante	ILWHEMWHEGLX ^u EASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTL KETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLX ^u QAWDLYYHVFRRI ISKTS	49
E2032I, T2098L mutante	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTL KETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI ISKTS	50
E2032L, T2098L mutante	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTL KETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI ISKTS	51

Otros conmutadores de dimerización adecuados incluyen un conmutador de dimerización basado en GyrB-GyrB, un conmutador de dimerización basado en giberelina, un conmutador de dimerización etiqueta/agregante y un conmutador de dimerización halo-tag/snap-tag. Siguiendo la orientación proporcionada en el presente documento, tales conmutadores y moléculas de dimerización pertinentes serán evidentes para alguien con experiencia normal.

Molécula de dimerización

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

La rapamicina y los análogos de la rapamicina (a veces denominados rapálogos), por ejemplo, RAD001, pueden utilizarse como moléculas de dimerización en un conmutador de dimerización basado en FKBP/FRB descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, la molécula de dimerización puede seleccionarse entre rapamicina (sirolimus), RAD001 (everolimus), zotarolimus, temsirolimus, AP-23573 (ridaforolimus), biolimus y AP21967. Otros análogos de la rapamicina adecuados para su uso con conmutadores de dimerización basados en FKBP/FRB se describen con más detalle en la sección titulada "Terapias de combinación", o en la subsección titulada "Combinación con un inhibidor de mTOR de baja dosis".

LA COEXPRESIÓN DE CAR CON UN RECEPTOR DE QUIMIOQUINAS

Como se describe en el presente documento, la célula que expresa CAR, por ejemplo, la célula que expresa NKR-CAR, por ejemplo, la célula que expresa KIR-CAR, descrita en el presente documento, comprende además una molécula receptora de quimioquinas. La expresión transgénica de los receptores de quimioquinas CCR2b o CXCR2 en las células T mejora el tráfico hacia los tumores sólidos que segregan CCL2 o CXCL1, incluidos el melanoma y el neuroblastoma (Craddock et al., J Immunother. 2010 Oct; 33(8):780-8 y Kershaw et al., Hum Gene Ther. 2002 Nov 1; 13(16): 1971-80). Por lo tanto, sin querer estar limitado por la teoría, se cree que los receptores de quimioquinas expresados en las células que expresan CAR que reconocen quimioquinas secretadas por los tumores, por ejemplo, los tumores sólidos, pueden mejorar la localización de la célula que expresa CAR en el tumor, facilitar la infiltración de

la célula que expresa CAR en el tumor y mejorar la eficacia antitumoral de la célula que expresa CAR. La molécula del receptor de quimioquinas puede comprender un receptor de quimioquinas natural o recombinante o un fragmento de unión a quimioquinas del mismo. Una molécula de receptor de quimioquina adecuada para la expresión en una célula que expresa CAR descrita en el presente documento incluye un receptor de quimioquina CXC (por ejemplo, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 o CXCR7), un receptor de quimioquina CC (por ejemplo, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 o CCR11), un receptor de quimioquinas CX3C (por ejemplo, CX3CR1), un receptor de quimioquinas XC (por ejemplo, XCR1) o un fragmento de unión a quimioquinas de los mismos. Como se describe en el presente documento, la molécula del receptor de quimioquinas que se expresará con un CAR descrito en el presente documento se selecciona en función de la(s) quimioquina(s) secretada(s) por el tumor. Como se describe en el presente documento, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento comprende además, por ejemplo, expresa un receptor CCR2b o un receptor CXCR2. Como se describe en el presente documento, el CAR descrito en el presente documento y la molécula del receptor de quimioquinas están en el mismo vector o están en dos vectores diferentes. Como se describe en el presente documento, cuando el CAR descrito en el presente documento y la molécula del receptor de quimioquinas están en el mismo vector, el CAR y la molécula del receptor de quimioquinas están cada uno bajo el control de dos promotores diferentes o están bajo el control del mismo promotor.

CONSTRUCTOS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAN UN CAR

La presente divulgación también describe moléculas de ácido nucleico que codifican una o más construcciones CAR descritas en el presente documento. En un caso, la molécula de ácido nucleico se proporciona como una transcripción de ARN mensajero. En un caso, la molécula de ácido nucleico se proporciona como un constructo de ADN.

Como se describe en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica un NKR-CAR descrito en el presente documento comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular o una molécula adaptadora.

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

Como se describe en el presente documento, el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el CAR deseado de la divulgación es un vector adenoviral (A5/35). Como se describe en el presente documento, la expresión de los ácidos nucleicos que codifican los CAR puede llevarse a cabo utilizando transposones como sleeping beauty, crisper, CAS9 y nucleasas de dedos de zinc. Véase más abajo Junio et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716.

En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican CARs se logra típicamente enlazando operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o porciones del mismo a un promotor, e incorporando el constructo en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación y la integración de eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para regular la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

Los constructos de expresión de la presente divulgación también pueden utilizarse para la inmunización de ácidos nucleicos y la terapia génica, utilizando protocolos estándar de suministro de genes. Los procedimientos de administración de genes son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo Pat. de EE.UU. Números 5.399.346, 5,580,859, 5,589,466. La divulgación describe un vector de terapia génica.

El ácido nucleico puede clonarse en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico puede clonarse en un vector que incluya, entre otros, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de especial interés son los de expresión, los de replicación, los de generación de sondas y los de secuenciación.

Además, el vector de expresión puede proporcionarse a una célula en forma de vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adeno asociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación

funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasas de restricción convenientes, y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, WO 01/96584 WO 01/29058y U.S. Pat. N° 6.326.193).

5 Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de suministro de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales mediante técnicas conocidas en la técnica. A continuación, el virus recombinante puede aislarse y administrarse a las células del sujeto, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Se conocen varios sistemas retrovirales en la técnica. En algunas realizaciones, se utilizan vectores de adenovirus. Se conocen varios vectores de adenovirus en la técnica. En una realización, se utilizan vectores lentivirus.

10 Elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de la iniciación transcripcional. Por lo general, se encuentran en la región de 30-110 pb aguas arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores contienen también elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio. El espacio entre los elementos promotores suele ser flexible, de modo que la función del promotor se mantiene cuando los elementos se invierten o se mueven unos respecto a otros. En el promotor de la timidina quinasa (tk), el espacio entre los elementos del promotor puede aumentarse hasta 50 pb antes de que la actividad comience a disminuir. 15 Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción.

Un ejemplo de promotor capaz de expresar un transgén CAR en una célula T de mamífero es el promotor EF1a. El promotor nativo EF1a impulsa la expresión de la subunidad alfa del complejo del factor de elongación-1, que es responsable de la administración enzimática de los aminoacil ARNt al ribosoma. El promotor EF1a se ha utilizado 20 ampliamente en plásmidos de expresión de mamíferos y ha demostrado ser eficaz para impulsar la expresión de CAR a partir de transgenes clonados en un vector lentiviral. Véase, por ejemplo Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). En un aspecto, el promotor de EF1a comprende la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 11.

Un ejemplo de promotor es la secuencia promotora temprana inmediata del citomegalovirus (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte, capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier 25 secuencia polinucleotídica unida operativamente a ella. Sin embargo, también pueden utilizarse otras secuencias promotoras constitutivas, como, por ejemplo, el promotor temprano del virus simio 40 (SV40), el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor de la repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor del MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor del factor de elongación-1a, así como 30 promotores de genes humanos como, por ejemplo, el promotor de la actina, el promotor de la miosina, el promotor de la hemoglobina y el promotor de la creatina quinasa. Además, la divulgación no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la divulgación. El uso de un promotor inducible proporciona un conmutador molecular capaz de activar la expresión de la secuencia polinucleotídica a la que está enlazado operativamente cuando se desea dicha expresión, o de desactivar la expresión cuando no se desea. 35 Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a un promotor de metalotioneína, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

Como se describe en el presente documento, el vector es un vector lentivirus. Como se describe en el presente documento, el vector comprende además un promotor. Como se describe en el presente documento, el promotor es un promotor EF-1.

40 Como se describe en el presente documento, el vector es un vector transcrito *in vitro*, por ejemplo, un vector que transcribe ARN de una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento. Como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además una cola de poli(A), por ejemplo, una cola de poli A descrita en el presente documento, por ejemplo, que comprende unas 150 bases de adenosina. Como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además una 45 3'UTR.

Otro ejemplo de promotor es el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK). Como se describe en el presente documento, se puede desear un promotor de PGK truncado (por ejemplo, un promotor de PGK con una o más, por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 100, 200, 300 o 400, deleciones de nucleótidos en comparación con la secuencia promotora de PGK de tipo salvaje). Las secuencias de nucleótidos de promotores de PGK ejemplares se proporcionan a 50 continuación.

Promotor WT PGK

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACG
CCTTGTGGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGTGTGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCG

GCGACGAGAGCCGCGGGGACGACTCGTCCGGCATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGA
 GGGACCGCGACAGGCAGAGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGCTT
 GCGGTTCTTGGAAAGGGCTGAATCCCCGCTCGTCTTCCGACGCGCCCGGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCT
 AGGCCACTGCGACGCTTGCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGCGACGCAAAGGGCCTTGGT
 GCGGGTCTCGTCCGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCAGCGGAACCTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCATAA
 GCT

(SEQ ID NO: 52)

Ejemplos de promotores PGK truncados:

PGK100

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACG
 CCTTGTGGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCG

(SEQ ID NO: 53)

5 PGK200

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACG
 CCTTGTGGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCG
 GCGACGAGAGCCGCGGGGACGACTCGTCCGGCATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG

(SEQ ID NO: 54)

PGK300

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACG
 CCTTGTGGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCG
 GCGACGAGAGCCGCGGGGACGACTCGTCCGGCATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGA
 GGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGCTT
 GCGGTTCTTGGAAAGGGCTGAATCCCCG

(SEQ ID NO: 55)

PGK400

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACG
 CCTTGTGGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCG
 GCGACGAGAGCCGCGGGGACGACTCGTCCGGCATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGA
 GGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGCTT
 GCGGTTCTTGGAAAGGGCTGAATCCCCGCTCGTCTTCCGACGCGCCCGGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCT
 AGGCCACTGCGACGCTTGCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG

(SEQ ID NO: 56)

10 Un vector también puede incluir, por ejemplo, una secuencia de señal para facilitar la secreción, una señal de
 poliadenilación y un terminador de la transcripción (por ejemplo, del gen de la hormona de crecimiento bovina (BGH)),
 un elemento que permita la replicación episomal y la replicación en procariontes (por ejemplo, el origen SV40 y ColE1
 u otros conocidos en la técnica) y/o elementos que permitan la selección (por ejemplo, el gen de resistencia a la
 15 ampicilina y/o el marcador de zeocina).

Para evaluar la expresión de un polipéptido CAR o de porciones del mismo, el vector de expresión que se introducirá
 en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen informador, o ambos, para facilitar la
 identificación y selección de las células expresantes de la población de células que se pretende transfectar o infectar
 mediante vectores virales. En otros casos, el marcador seleccionable puede llevarse en un fragmento separado de
 20 ADN y utilizarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes
 informadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras adecuadas para permitir la expresión en las
 células huésped. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a los antibióticos,
 como neo y similares.

Los genes reporteros se utilizan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad
 de las secuencias reguladoras. En general, un gen reportero es un gen que no está presente en el organismo o tejido
 receptor ni se expresa en él y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente
 detectable, por ejemplo, la actividad enzimática. La expresión del gen reportero se evalúa en un momento adecuado
 después de la introducción del ADN en las células receptoras. Los genes informadores adecuados pueden incluir
 genes que codifican la luciferasa, la beta-galactosidasa, la cloranfenicol acetil transferasa, la fosfatasa alcalina
 25 secretada o el gen de la proteína verde fluorescente (por ejemplo, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Los
 sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y pueden prepararse mediante técnicas conocidas u obtenerse
 30 comercialmente. En general, se identifica como promotor el constructo con la mínima región flanqueante 5' que
 muestra el mayor nivel de expresión del gen reportero. Estas regiones promotoras pueden vincularse a un gen
 reportero y utilizarse para evaluar la capacidad de los agentes de modular la transcripción impulsada por el promotor.

Como se describe en el presente documento, el vector puede comprender además un ácido nucleico que codifica un segundo CAR, por ejemplo, un segundo NKR-CAR, un TCAR o un CAR inhibidor. Como se describe en el presente documento, el segundo CAR incluye un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno diana, por ejemplo, un antígeno tumoral descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, el antígeno unido por el primer CAR es el mismo antígeno que el unido por el segundo CAR. Alternativamente, el antígeno unido por el primer CAR es un antígeno diferente al unido por el segundo CAR. Por ejemplo, el primer CAR se une a la mesotelina, mientras que el segundo CAR se une a un antígeno tumoral diferente o a un antígeno presente en una célula normal.

Como se describe en el presente documento, el vector comprende un ácido nucleico que codifica un NKR-CAR descrito en el presente documento y un ácido nucleico que codifica un TCAR. Como se describe en el presente documento, el TCAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral diferente al que se une el NKR-CAR. Como se describe en el presente documento, el TCAR comprende el dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, en el que el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario descrito en el presente documento, por ejemplo, CD3zeta o proporcionado en la Tabla 2, y opcionalmente, uno o más dominios de señalización coestimuladora descritos en el presente documento, por ejemplo, 4-1BB, CD28, CD27, ICOS, o proporcionado en la Tabla 3.

Como se describe en el presente documento, el vector comprende un ácido nucleico que codifica un NKR-CAR descrito en el presente documento y un ácido nucleico que codifica un CAR inhibidor. Como se describe en el presente documento, el CAR inhibidor comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno que se encuentra en las células normales pero no en las células cancerosas, por ejemplo, células normales que también expresan el antígeno reconocido por el NKR-CAR. En una realización, el CAR inhibidor comprende el dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula inhibidora. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR inhibidor puede ser un dominio intracelular de PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta.

Como se describe en el presente documento, el vector puede comprender dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican un CAR, por ejemplo, un NKR-CAR descrito en el presente documento y un segundo CAR, por ejemplo, un segundo NKR-CAR, un CAR inhibidor o un TCAR que se une específicamente a un antígeno distinto del reconocido por el primer NKR-CAR. Como se describe en el presente documento, las dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican el CAR están codificadas por una única molécula nucleica en el mismo marco y como una única cadena polipeptídica. En este caso, los dos o más CARs, pueden, por ejemplo, estar separados por uno o más sitios de escisión de péptidos (por ejemplo, un sitio de auto-escisión o un sustrato para una proteasa intracelular).

Como se describe en el presente documento, el vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un NKR-CAR descrito puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula adaptadora. Como se describe en el presente documento, las dos o más secuencias de ácido nucleico están codificadas por una única molécula nucleica en el mismo marco y como una única cadena polipeptídica. Como se describe en el presente documento, el NKR-CAR y la molécula adaptadora pueden estar separados por uno o más sitios de escisión peptídica (por ejemplo, un sitio de autoescisión o un sustrato para una proteasa intracelular), en el que el NKR-CAR, la molécula adaptadora y el sitio de escisión peptídica están en el mismo marco y se codifican como una sola cadena polipeptídica.

Los ejemplos de sitios de escisión de péptidos incluyen los siguientes, en los que los residuos GSG son opcionales:

T2A: (GSG) E G R G S L L T C G D V E E N P G P (SEQ ID NO: 57)

P2A: (GSG) A T N F S L K Q A G D V E E N P G P (SEQ ID NO: 58)

E2A: (GSG) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (SEQ ID NO: 59)

F2A: (GSG) V K Q T L N F D L K L A G D V E S N P G P (SEQ ID NO: 60)

Los procedimientos de introducción y expresión de genes en una célula son conocidos en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector puede introducirse fácilmente en una célula huésped, por ejemplo, una célula de mamífero, de bacteria, de levadura o de insecto por cualquier procedimiento de la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión puede transferirse a una célula huésped por medios físicos, químicos o biológicos.

Los polinucleótidos pueden introducirse en las células diana utilizando cualquiera de los diferentes procedimientos, por ejemplo, procedimientos comercialmente disponibles que incluyen, pero no se limitan a, la electroporación (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o el Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), el Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), la transfección mediada por liposomas catiónicos mediante lipofección, la encapsulación de polímeros, la transfección mediada por péptidos, o los sistemas de suministro de partículas biolíticas como las "pistolas de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther, 12(8):861-70 (2001).

Los procedimientos físicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen la precipitación de fosfato de calcio, la lipofección, el bombardeo de partículas, la microinyección, la electroporación y otros similares. Los procedimientos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY).

Los procedimientos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los retrovirales, se han convertido en el procedimiento más utilizado para insertar genes en células de mamíferos, por ejemplo, humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adeno-asociados, y similares. Véase, por ejemplo, La Pat. de los EE.UU. Números 5.350.674 y 5,585,362.

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para su uso como vehículo de administración *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

En el caso de que se utilice un sistema de suministro no viral, un vehículo de suministro ejemplar es un liposoma. Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula huésped (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). En otro caso, el ácido nucleico puede estar asociado a un lípido. El ácido nucleico asociado a un lípido puede estar encapsulado en el interior acuoso de un liposoma, intercalado dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma mediante una molécula de enlace que esté asociada tanto al liposoma como al oligonucleótido, atrapado en un liposoma, complejado con un liposoma, dispersado en una solución que contenga un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o complejado con una micela, o asociado de otro modo con un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vectores de expresión no están limitadas a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden estar simplemente intercalados en una solución, formando posiblemente agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser naturales o sintéticas. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotas de grasa que se producen naturalmente en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, como los ácidos grasos, los alcoholes, las aminas, los aminoalcoholes y los aldehídos. En el caso de que se utilice un sistema de suministro no viral, un vehículo de suministro ejemplar es un liposoma. Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula huésped (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado a un lípido. El ácido nucleico asociado a un lípido puede estar encapsulado en el interior acuoso de un liposoma, intercalado dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma mediante una molécula de enlace que esté asociada tanto al liposoma como al oligonucleótido, atrapado en un liposoma, complejado con un liposoma, dispersado en una solución que contenga un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o complejado con una micela, o asociado de otro modo con un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vectores de expresión no están limitadas a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden estar simplemente intercalados en una solución, formando posiblemente agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser naturales o sintéticas. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotas de grasa que se producen naturalmente en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, como los ácidos grasos, los alcoholes, las aminas, los aminoalcoholes y los aldehídos.

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

Independientemente del procedimiento utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula huésped o exponer de otro modo una célula al inhibidor de la presente divulgación, a fin de confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula huésped, pueden realizarse diversos ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la materia, como transferencia Southern

y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", como la detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISAs y transferencia Western) o por ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que entran en el ámbito de la divulgación.

La presente divulgación describe además un vector que comprende una molécula de ácido nucleico codificante de CAR. En un aspecto, un vector CAR puede transducirse directamente en una célula, por ejemplo, una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T o una célula NK. En un caso, el vector es un vector de clonación o de expresión, por ejemplo, un vector que incluye, pero no se limita a, uno o más plásmidos (*por ejemplo*, plásmidos de expresión, vectores de clonación, minicírculos, minivectores, cromosomas de doble minuto), constructos de vectores retrovirales y lentivirales. En un aspecto, el vector es capaz de expresar el constructo CAR en células efectoras inmunitarias de mamíferos, por ejemplo, células T de mamíferos o células NK de mamíferos. En un caso, la célula T de mamífero es una célula T humana.

TRANSFECCIÓN DE ARN

En el presente documento se describen procedimientos para producir un ARN CAR transcrito *in vitro*, por ejemplo, un ARN NKR-CAR. La presente divulgación también incluye un constructo de ARN codificante de NKR-CAR que puede transfectarse directamente en una célula. Como se describe en el presente documento, el constructo de ARN que codifica NKR-CAR comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un TCAR descrito en el presente documento. Un procedimiento para generar ARNm para su uso en la transfección puede implicar la transcripción *in vitro* (IVT) de una plantilla con cebadores especialmente diseñados, seguida de la adición de poliA, para producir un constructo que contenga la secuencia no traducida ("UTR") 3' y 5', una tapa 5' y/o un sitio de entrada del ribosoma interno (IRES), el ácido nucleico que se va a expresar, y una cola de poliA, típicamente de 50-2000 bases de longitud (SEQ ID NO: 35). El ARN así producido puede transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En un caso, la plantilla incluye secuencias para el NKR-CAR.

En un caso, el NKR-CAR está codificado por un ARN mensajero (ARNm). En un caso, el ARNm que codifica el NKR-CAR se introduce en una célula T para la producción de una célula NKR-CAR. En un caso, el ARNm que codifica el NKR-CAR se introduce en una célula NK para la producción de una célula NKR-CAR.

Como se describe en el presente documento, el ARN transcrito *in vitro* NKR-CAR puede introducirse en una célula como una forma de transfección transitoria. El ARN se produce por transcripción *in vitro* utilizando una plantilla generada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés procedente de cualquier fuente puede convertirse directamente mediante PCR en un molde para la síntesis *in vitro* de ARNm utilizando los cebadores adecuados y la ARN polimerasa. La fuente de ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN de plásmido, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente de ADN apropiada. Como se describe en el presente documento, la plantilla deseada para la transcripción *in vitro* es un NKR-CAR de la presente divulgación. Por ejemplo, la plantilla del ARN NKR-CAR comprende una región extracelular que comprende un dominio variable de cadena única de un anticuerpo antitumoral; una región bisagra, un dominio transmembrana (por ejemplo, un dominio transmembrana de KIR). En una realización, la plantilla deseada para la transcripción *in vitro* comprende KIR-CAR y DAP12 en plantillas separadas. Como se describe en el presente documento, el temple deseado para la transcripción *in vitro* comprende KIR-CAR y DAP12 en la misma plantilla. El modelo de DAP12 comprende un dominio transmembrana y una región intracelular.

Como se describe en el presente documento, el ADN que se utilizará para la PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede proceder de una secuencia de ADN natural del genoma de un organismo. Como se describe en el presente documento, el ácido nucleico puede incluir algunas o todas las regiones no traducidas (UTR) 5' y/o 3'. El ácido nucleico puede incluir exones e intrones. Como se describe en este documento, el ADN que se utilizará para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humano que incluye los UTRs 5' y 3'. El ADN puede ser alternativamente una secuencia de ADN artificial que no se expresa normalmente en un organismo natural. Una secuencia de ADN artificial ejemplar es aquella que contiene porciones de genes que se ligan para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las porciones de ADN que se ligan pueden ser de un solo organismo o de más de un organismo.

La PCR se utiliza para generar una plantilla para la transcripción *in vitro* del ARNm que se utiliza para la transfección. Los procedimientos para realizar la PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores que se utilizan en la PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias a las regiones del ADN que se utilizará como plantilla para la PCR. "Sustancialmente complementario", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos en las que la mayoría o todas las bases de la secuencia del cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias, o no coinciden. Las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de reconocer o hibridarse con la diana de ADN prevista en las condiciones de reconocer utilizadas para la PCR. Los cebadores pueden ser diseñados para ser sustancialmente complementarios a cualquier porción del molde de ADN. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse para amplificar la porción de un ácido nucleico que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluyendo los UTRs 5' y 3'. Los cebadores también pueden diseñarse para amplificar una porción de un ácido nucleico que codifica un dominio particular de interés. Como se describe en este documento, los cebadores están diseñados para amplificar la región

codificante de un ADNc humano, incluyendo la totalidad o partes de las UTRs 5' y 3'. Los cebadores útiles para la PCR pueden generarse por procedimientos sintéticos bien conocidos en la técnica. Los "cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos de la plantilla de ADN que están antes de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Aguas arriba" se utiliza en el presente documento para referirse a una ubicación 5, a la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la cadena codificante. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a una plantilla de ADN de doble cadena que se encuentra aguas abajo de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Corriente descendente" se utiliza en el presente documento para referirse a una ubicación 3' de la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la cadena codificante.

10 Cualquier ADN polimerasa útil para la PCR puede utilizarse en los procedimientos divulgados en el presente documento. Los reactivos y la polimerasa están disponibles comercialmente en varias fuentes.

También se pueden utilizar estructuras químicas con la capacidad de promover la estabilidad y/o la eficiencia de la traducción. El ARN tiene preferentemente UTRs 5' y 3'. Como se describe en este documento, la UTR 5' tiene una longitud de entre uno y 3000 nucleótidos. La longitud de las secuencias UTR 5' y 3' que se añaden a la región codificante puede modificarse por diferentes procedimientos, incluyendo, entre otros, el diseño de cebadores para la PCR que se acoplan a diferentes regiones de las UTR. Utilizando este enfoque, un experto en la materia puede modificar las longitudes 5' y 3' de la UTR necesarias para lograr una eficiencia de traducción óptima tras la transfección del ARN transcrito.

Las UTRs 5' y 3' pueden ser las UTRs 5' y 3' endógenas que ocurren naturalmente para el ácido nucleico de interés. Alternativamente, las secuencias UTR que no son endógenas al ácido nucleico de interés pueden añadirse incorporando las secuencias UTR en los cebadores directos e inversos o mediante cualquier otra modificación de la plantilla. El uso de secuencias UTR que no son endógenas al ácido nucleico de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficiencia de traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en UA en las secuencias 3' UTR pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, las UTRs 3' pueden ser seleccionadas o diseñadas para aumentar la estabilidad del ARN transcrito basándose en las propiedades de las UTRs que son bien conocidas en la técnica.

Como se describe en el presente documento, el 5' UTR puede contener la secuencia Kozak del ácido nucleico endógeno. Alternativamente, cuando se añade por PCR una UTR 5' que no es endógena al ácido nucleico de interés, como se ha descrito anteriormente, se puede rediseñar una secuencia Kozak consenso añadiendo la secuencia UTR 5'. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficiencia de la traducción de algunos transcritos de ARN, pero no parece ser necesario para que todos los ARN permitan una traducción eficiente. El requisito de las secuencias de Kozak para muchos ARNm es conocido en la técnica. En otros casos, la 5' UTR puede ser la 5'UTR de un virus de ARN cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otros casos se pueden utilizar varios análogos de nucleótidos en la UTR 3' o 5' para impedir la degradación del ARNm por la exonucleasa.

Para permitir la síntesis de ARN a partir de una plantilla de ADN sin necesidad de clonación de genes, se debe unir un promotor de transcripción a la plantilla de ADN aguas arriba de la secuencia a transcribir. Cuando una secuencia que funciona como promotor de una ARN polimerasa se añade al extremo 5' del cebador directo, el promotor de la ARN polimerasa se incorpora al producto de la PCR aguas arriba del marco de lectura abierto que se va a transcribir. En un caso, el promotor es un promotor de la polimerasa T7, como se describe en otra parte del presente documento. Otros promotores útiles son, entre otros, los promotores de la ARN polimerasa T3 y SP6. Las secuencias de nucleótidos de consenso para los promotores T7, T3 y SP6 son conocidas en la técnica.

Como se describe en el presente documento, el ARNm tiene una tapa en el extremo 5' y una cola 3' de poli(A) que determinan la unión al ribosoma, la iniciación de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En una plantilla de ADN circular, por ejemplo, el ADN plasmídico, la ARN polimerasa produce un producto concatérico largo que no es adecuado para la expresión en las células eucariotas. La transcripción del ADN plasmídico linealizado al final de la UTR 3' da lugar a un ARNm de tamaño normal que no es eficaz en la transfección eucariótica, incluso si se poliadenila después de la transcripción.

En una plantilla de ADN lineal, la ARN polimerasa del fago T7 puede extender el extremo 3' de la transcripción más allá de la última base de la plantilla (Schenborn y Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985) Nacheva y Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem, 270:1485-65 (2003).

El procedimiento convencional de integración de tramos de poliA/T en una plantilla de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia poliA/T integrada en el ADN plasmídico puede causar inestabilidad en el plásmido, por lo que las plantillas de ADN plasmídico obtenidas de células bacterianas suelen estar muy contaminadas con deleciones y otras aberraciones. Esto hace que los procedimientos de clonación no sólo sean laboriosos y lentos, sino que a menudo no son fiables. Por ello, es muy deseable un procedimiento que permita la construcción de plantillas de ADN con el tramo 3' de poliA/T sin necesidad de clonación.

El segmento poliA/T de la plantilla de ADN transcripcional puede producirse durante la PCR utilizando un cebador inverso que contenga una cola poliT, como la cola 100T (SEQ ID NO: 31) (el tamaño puede ser de 50-5000 T (SEQ ID NO: 32)), o después de la PCR por cualquier otro procedimiento, incluyendo, pero sin limitarse a ello, la ligadura de

ADN o la recombinación *in vitro*. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. En general, la longitud de una cola de poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, la cola de poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas (SEQ ID NO: 33).

5 Las colas de poli(A) de los ARN pueden extenderse aún más después de la transcripción *in vitro* con el uso de una polimerasa de poli(A), como la polimerasa de *E. coli* (E-PAP). En una realización, el aumento de la longitud de una cola de poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos (SEQ ID NO: 34) da lugar a un aumento de aproximadamente el doble de la eficiencia de traducción del ARN. Además, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Dicha fijación puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos del ATP pueden incorporarse a la cola del poli(A) utilizando la poli(A) polimerasa. Los análogos del ATP pueden aumentar aún más la estabilidad del ARN.

10 Las tapas 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En una realización preferida, los ARN producidos por los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen una tapa 5'. La tapa 5' se proporciona mediante técnicas conocidas en la técnica y descritas en el presente documento (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 15 330:958-966 (2005)).

Los ARNs producidos por los procedimientos revelados en el presente documento también pueden contener una secuencia de sitio de entrada al ribosoma interno (IRES). La secuencia IRES puede ser cualquier secuencia viral, cromosómica o diseñada artificialmente que inicie la unión del ribosoma independiente de la tapa al ARNm y facilite el inicio de la traducción. Puede incluirse cualquier soluto adecuado para la electroporación celular, que puede contener factores que faciliten la permeabilidad y la viabilidad celular, como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

20 El ARN puede ser introducido en las células diana usando cualquiera de los diferentes procedimientos, por ejemplo, procedimientos comercialmente disponibles que incluyen, pero no se limitan a, la electroporación (Amara Nucleofector-II (Amara Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o el Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), el Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), la transfección mediada por liposomas catiónicos mediante lipofección, la encapsulación de polímeros, la transfección mediada por péptidos, o los sistemas de suministro de partículas biológicas como las "pistolas de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther, 12(8):861-70 (2001)).

30 Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas pueden obtenerse utilizando procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, como, por ejemplo, mediante el cribado de bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que lo incluye, o aislando directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el gen de interés puede ser producido sintéticamente, en lugar de ser clonado.

Procedimientos de suministro no virales

35 En algunos casos, se pueden utilizar procedimientos no virales para suministrar un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo, un NKR-CAR o un TCAR, descrito en el presente documento en una célula o tejido o en un sujeto.

40 Como se describe en el presente documento, el procedimiento no viral incluye el uso de un transposón (también llamado elemento transponible). Como se describe en el presente documento, un transposón es un trozo de ADN que puede insertarse en un lugar de un genoma, por ejemplo, un trozo de ADN que es capaz de autorreplicarse e insertar su copia en un genoma, o un trozo de ADN que puede empalmarse de un ácido nucleico más largo e insertarse en otro lugar de un genoma. Por ejemplo, un transposón comprende una secuencia de ADN formada por repeticiones invertidas que flanquean los genes de transposición.

45 Los procedimientos ejemplares de suministro de ácido nucleico utilizando un transposón incluyen un sistema de transposón de la Bella Durmiente (SBTS) y un sistema de transposón piggyBac (PB). Véase, por ejemplo Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20.R1(2011):R14-20 Singh et al. Cancer Res. 15(2008):2961-2971 Huang et al. Mol. Ther. 16(2008):580-589 Grabundzija et al. Mol. Ther. 18(2010):1200-1209 Kebriaei et al. Blood. 122.21(2013):166; Williams. Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16 Bell et al. Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65y Ding et al. Celular. 122.3(2005):473-83.

50 El SBTS incluye dos componentes: 1) un transposón que contenga un transgén y 2) una fuente de enzima transposasa. La transposasa puede transponer el transposón desde un plásmido portador (u otro ADN donante) a un ADN objetivo, como el cromosoma/genoma de una célula huésped. Por ejemplo, la transposasa se une al plásmido portador/ADN donante, corta el transposón (incluidos los transgenes) del plásmido y lo inserta en el genoma de la célula huésped. Véase, por ejemplo, Aronovich et al. *supra*.

55 Los transposones ejemplares incluyen un transposón basado en pT2. Véase, por ejemplo Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47y Singh et al. Cancer Res. 68.8(2008): 2961-2971. Las transposasas ejemplares incluyen una transposasa de tipo Tc1/mariner, por ejemplo, la transposasa SB10 o la transposasa SB11 (una

transposasa hiperactiva que puede expresarse, por ejemplo, a partir de un promotor de citomegalovirus). Véase, por ejemplo, Aronovich et al.; Kebriaei et al.; y Grabundzija et al.

5 El uso del SBTS permite la integración y expresión eficiente de un transgén, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento. En el presente documento se describen procedimientos para generar una célula, por ejemplo, una célula T o una célula NK, que exprese de forma estable un CAR descrito en el presente documento, por ejemplo, utilizando un sistema de transposones como el SBTS.

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

20 Como se describe en el presente documento, se generan células, por ejemplo, células T o NK, que expresan un CAR descrito en el presente documento mediante una combinación de inserción de genes utilizando el SBTS y la edición genética utilizando una nucleasa (por ejemplo, nucleasas de dedo de zinc (ZFN), nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN), el sistema CRISPR/Cas o endonucleasas de reingeniería de meganucleasas).

25 Como se describe en el presente documento, el uso de un procedimiento no viral de suministro permite la reprogramación de células, por ejemplo, células T o NK, y la infusión directa de las células en un sujeto. Las ventajas de los vectores no virales incluyen, entre otras, la facilidad y el coste relativamente bajo de producir las cantidades suficientes necesarias para satisfacer a una población de pacientes, la estabilidad durante el almacenamiento y la falta de inmunogenicidad.

30 Como se describe en el presente documento, cuando se utiliza un sistema de suministro no viral, un vehículo de suministro ejemplar es un liposoma. Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula huésped (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). En otro caso, el ácido nucleico puede estar asociado a un lípido. El ácido nucleico asociado a un lípido puede estar encapsulado en el interior acuoso de un liposoma, intercalado dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma mediante una molécula de enlace que esté asociada tanto al liposoma como al oligonucleótido, atrapado en un liposoma, complejado con un liposoma, dispersado en una solución que contenga un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o complejado con una micela, o asociado de otro modo con un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vectores de expresión no están limitadas a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden estar simplemente intercalados en una solución, formando posiblemente agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser naturales o sintéticas. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotas de grasa que se producen naturalmente en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, como los ácidos grasos, los alcoholes, las aminas, los aminoalcoholes y los aldehídos.

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

FUENTES DE CÉLULAS

Antes de la expansión y la modificación genética, se obtiene una fuente de células (por ejemplo, células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T o células NK) de un sujeto. El término "sujeto" incluye a los organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, los mamíferos). Algunos ejemplos de sujetos son los seres humanos, los perros, los gatos, los ratones, las ratas y sus especies transgénicas. Las células T pueden obtenerse de diversas fuentes, como las células mononucleares de la sangre periférica, la médula ósea, el tejido de los ganglios linfáticos, la sangre del cordón umbilical, el tejido del timo, el tejido de un foco de infección, la ascitis, el derrame pleural, el tejido del bazo y los tumores.

Como se describe en el presente documento, se puede utilizar cualquier número de líneas de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T o células NK) disponibles en la técnica. Como se describe en el presente documento, las células T pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre recogida de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por la persona experimentada, como la separación de Ficoll™. Como se describe en este documento, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis suele contener linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. Como se describe en el presente documento, las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para los pasos de procesamiento posteriores. Como se describe en este documento, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Como se describe en este documento, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos cationes divalentes, si no de todos. Los pasos iniciales de activación en ausencia de calcio conducen a una activación magnificada. Como los expertos en la materia apreciarán fácilmente, la etapa de lavado puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, como el uso de una centrífuga semiautomatizada de flujo continuo (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, el Baxter CytoMate o el Haemonetics Cell Saver 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras el lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles, como, por ejemplo, PBS sin Ca ni Mg, PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Alternativamente, los componentes indeseables de la muestra de aféresis pueden ser eliminados y las células resuspendidas directamente en medios de cultivo.

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

Como se describe en el presente documento, las células T se aíslan de los linfocitos de la sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, por centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o por elutriación centrífuga a contracorriente. Una subpoblación específica de células T, como las células CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y CD45RO+T, puede aislarse aún más mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, las células T se aíslan mediante la incubación con perlas conjugadas con anti-CD3/anti-CD28 (por ejemplo, 3x28), como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. Como se describe en el presente documento, el período de tiempo es de unos 30 minutos. Como se describe en este documento, el período de tiempo oscila entre 30 minutos y 36 horas o más y todos los valores enteros entre ellos. Como se describe en el presente documento, el período de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. Como se describe en este documento, el período de tiempo es de 10 a 24 horas. Como se describe en este documento, el período de incubación es de 24 horas. Para el aislamiento de células T de pacientes con leucemia, el uso de tiempos de incubación más largos, como 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular. Se pueden utilizar tiempos de incubación más largos para aislar células T en cualquier situación en la que haya pocas células T en comparación con otros tipos de células, como en el aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) a partir de tejido tumoral o de individuos inmunodeprimidos. Además, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficacia de la captura de células T CD8+. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo que se permite a las células T unirse a las perlas CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de perlas con respecto a las células T (como se describe más adelante), se pueden seleccionar preferentemente subpoblaciones de células T a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros momentos del proceso. Además, al aumentar o disminuir la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas u otra superficie, se pueden seleccionar preferentemente subpoblaciones de células T a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros momentos deseados. La persona experimentada reconocería que también se pueden utilizar rondas múltiples de selección en el contexto de esta divulgación. Como se describe en el presente documento, puede ser deseable realizar el procedimiento de selección y utilizar las células "no seleccionadas" en el proceso de activación y expansión. Las células "no seleccionadas" también pueden ser sometidas a nuevas rondas de selección.

El enriquecimiento de una población de células T por selección negativa puede lograrse con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un procedimiento es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de la superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales suele incluir anticuerpos contra CD 14, CD20, CD11b, CD 16, HLA-DR y CD8. Como se describe en el presente documento, puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente las células

T reguladoras que suelen expresar CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+ y FoxP3+. Alternativamente, las células reguladoras T se agotan mediante perlas conjugadas anti-CD25 u otro procedimiento de selección similar.

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

Como se describe en el presente documento, las células reguladoras T, por ejemplo, las células T CD25+, se eliminan de la población utilizando un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25, IL-2. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o el ligando de unión a CD25 se conjuga con un sustrato, por ejemplo, una perla, o se recubre de otro modo en un sustrato, por ejemplo, una perla. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, se conjuga con un sustrato como se describe en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, las células reguladoras T, por ejemplo, las células T CD25+, se eliminan de la población utilizando el reactivo de depleción de CD25 de Miltenyi™. Como se describe en el presente documento, la relación de células con respecto al reactivo de depleción de CD25 es de 1e7 células por 20 ul, o 1e7 células por 15 ul, o 1e7 células por 10 ul, o 1e7 células por 5 ul, o 1e7 células por 2,5 ul, o 1e7 células por 1,25 ul. Como se describe en el presente documento, por ejemplo, para las células reguladoras T, por ejemplo, el agotamiento de CD25+, se utilizan más de 500 millones de células/ml. En otro caso, se utiliza una concentración de células de 600, 700, 800 o 900 millones de células/ml.

Como se describe en el presente documento, la población de células efectoras inmunitarias que se deben agotar incluye aproximadamente 6×10^9 células T CD25+. En otros casos, la población de células efectoras inmunitarias que se debe reducir incluye entre 1×10^9 y 1×10^{10} células T CD25+, y cualquier valor entero intermedio. Como se describe en el presente documento, la población resultante de células reguladoras T agotadas tiene 2×10^9 células reguladoras T, por ejemplo, células CD25+, o menos (por ejemplo, 1×10^9 , 5×10^8 , 1×10^8 , 5×10^7 , 1×10^7 , o menos células CD25+).

Como se describe en el presente documento, las células reguladoras T, por ejemplo, las células CD25+, se eliminan de la población utilizando el sistema CliniMAC con un conjunto de tubos de depleción, como, por ejemplo, el tubo 162-01. Como se describe en este documento, el sistema CliniMAC se ejecuta en una configuración de agotamiento como, por ejemplo, DEPLETION2.1.

Sin querer estar atado a una teoría en particular, disminuir el nivel de reguladores negativos de las células inmunes (por ejemplo, disminuir el número de células inmunes no deseadas, por ejemplo, células T_{REG}), en un sujeto antes de la aféresis o durante la fabricación de un producto celular que exprese CAR puede reducir el riesgo de recaída del sujeto. Por ejemplo, los procedimientos para reducir las células T_{REG} son conocidos en la técnica. Los procedimientos para disminuir las células T_{REG} incluyen, entre otros, la ciclofosfamida, el anticuerpo anti-GITR (un anticuerpo anti-GITR descrito en el presente documento), la depleción de CD25 y combinaciones de los mismos.

Como se describe en el presente documento, los procedimientos de fabricación comprenden la reducción del número de células T_{REG} (por ejemplo, el agotamiento) antes de la fabricación de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, los procedimientos de fabricación comprenden el contacto de la muestra, por ejemplo, la muestra de aféresis, con un anticuerpo anti-GITR y/o un anticuerpo anti-CD25 (o fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25), por ejemplo, para agotar las células T_{REG} antes de la fabricación del producto de células que expresan CAR (por ejemplo, células T, células NK).

Como se describe en el presente documento, un sujeto es pretratado con una o más terapias que reducen las células T_{REG} antes de la recolección de células para la fabricación del producto celular que expresa CAR, reduciendo así el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR. Como se describe en el presente documento, los procedimientos para disminuir las células T_{REG} incluyen, pero no se limitan a, la administración al sujeto de uno o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25, o una combinación de los mismos. La administración de una o más de las siguientes sustancias: ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25, o una combinación de las mismas, puede ocurrir antes, durante o después de una infusión del producto celular que expresa CAR.

Como se describe en el presente documento, un sujeto es pretratado con ciclofosfamida antes de la recolección de células para la fabricación del producto celular que expresa CAR, reduciendo así el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR. Como se describe en el presente documento, un sujeto es pretratado con un anticuerpo anti-GITR antes de la recogida de células para la fabricación del producto celular que expresa CAR, reduciendo así el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR.

Como se describe en el presente documento, la población de células que debe eliminarse no son las células T reguladoras ni las células tumorales, sino las células que de otro modo afectan negativamente la expansión y/o la función de las células CART, por ejemplo, las células que expresan CD14, CD11b, CD33, CD15 u otros marcadores expresados por las células potencialmente inmunosupresoras. Como se describe en el presente documento, se prevé

que dichas células se eliminen al mismo tiempo que las células T reguladoras y/o las células tumorales, o después de dicho agotamiento, o en otro orden.

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

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir además la eliminación de células de la población que expresan un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral que no comprende CD25, por ejemplo, CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 o CD11b, para proporcionar así una población de células agotadas reguladoras T, por ejemplo, agotadas CD25+, y agotadas de antígeno tumoral que son adecuadas para la expresión de un CAR, por ejemplo, un CAR descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, las células que expresan antígenos tumorales se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras, por ejemplo, las células CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, y un anticuerpo antitumoral, o un fragmento del mismo, pueden estar unidos al mismo sustrato, por ejemplo, una perla, que puede utilizarse para eliminar las células o un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o el anticuerpo antitumoral, o un fragmento del mismo, pueden estar unidos a perlas separadas, una mezcla de las cuales puede utilizarse para eliminar las células. Como se describe en el presente documento, la eliminación de las células reguladoras T, por ejemplo, las células CD25+, y la eliminación de las células que expresan antígenos tumorales es secuencial, y puede ocurrir, por ejemplo, en cualquier orden.

También se proporcionan procedimientos que incluyen la eliminación de células de la población que expresan un inhibidor del punto de control, por ejemplo, un inhibidor del punto de control descrito en el presente documento, por ejemplo, una o más de las células PD1+, las células LAG3+ y las células TIM3+, para proporcionar así una población de células reguladoras T agotadas, por ejemplo, células CD25+ agotadas, y células agotadas del inhibidor del punto de control, por ejemplo, células PD1+, LAG3+ y/o TIM3+ agotadas. Algunos ejemplos de inhibidores de puntos de control son B7-H1, B7-1, CD160, P1H, 2B4, PD1, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, TIGIT, CTLA-4, BTLA y LAIR1. Como se describe en el presente documento, las células que expresan inhibidores del punto de control se eliminan simultáneamente con las células reguladoras T, por ejemplo, las células CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, y un anticuerpo inhibidor del punto de control, o un fragmento del mismo, pueden unirse a la misma perla que puede utilizarse para eliminar las células, o un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, y el anticuerpo inhibidor del punto de control, o un fragmento del mismo, pueden unirse a perlas separadas, una mezcla de las cuales puede utilizarse para eliminar las células. Como se describe en el presente documento, la eliminación de las células reguladoras T, por ejemplo, las células CD25+, y la eliminación de las células que expresan inhibidores del punto de control es secuencial, y puede ocurrir, por ejemplo, en cualquier orden.

Como se describe en el presente documento, se puede seleccionar una población de células T que exprese una o más de las siguientes moléculas: IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B y perforina, u otras moléculas apropiadas, por ejemplo, otras citoquinas. Los procedimientos de cribado de la expresión celular pueden determinarse, por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en WO 2013/126712.

Para el aislamiento de una población deseada de células por selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y la superficie (por ejemplo, partículas como perlas). Como se describe en el presente documento, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (es decir, aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las perlas. Por ejemplo, en una realización, se utiliza una concentración de 2 mil millones de células/ml. Como se describe en este documento, se utiliza una concentración de 1.000 millones de células/ml. Como se describe en este documento, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En otra realización, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. Como se describe en el presente documento, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. Tal como se describe en el presente documento, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de concentraciones elevadas puede dar lugar a un mayor rendimiento celular, a la activación de las células y a su expansión. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, como las células T CD28-negativas, o de muestras en las que hay muchas células tumorales presentes (es decir, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Estas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de las células T CD8+ que normalmente tienen una expresión más débil de CD28.

Como se describe en el presente documento, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Al diluir significativamente la mezcla de células T y la superficie (por ejemplo, partículas como perlas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona las células que expresan altas cantidades de antígenos

deseados para ser unidos a las partículas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4+ expresan niveles más altos de CD28 y son capturados con mayor eficacia que los linfocitos T CD8+ en concentraciones diluidas. Como se describe en este documento, la concentración de células utilizada es de 5×10^6 /ml. En otras realizaciones, la concentración utilizada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /m la 1×10^9 /ml, y cualquier valor entero intermedio.

- 5 Como se describe en este documento, las células pueden ser incubadas en un rotador por diferentes períodos de tiempo a diferentes velocidades ya sea a 2-10 °C o a temperatura ambiente.

Las células T para la estimulación también pueden ser congeladas después de un paso de lavado. Sin querer ceñirse a la teoría, la etapa de congelación y posterior descongelación proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular. Tras el paso de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Aunque muchas soluciones y parámetros de congelación son conocidos en la técnica y serán útiles en este contexto, un procedimiento consiste en utilizar PBS que contenga 20 % de DMSO y 8 % de albúmina de suero humano, o medios de cultivo que contengan 10 % de dextrano 40 y 5 % de dextrosa, 20 % de albúmina de suero humano y 7,5 % de DMSO, o 31,25 % de Plasmalyte-A, 31,25 % Dextrosa 5 %, 0,45 % NaCl, 10 % Dextrano 40 y 5 % Dextrosa, 20 % Albúmina de suero humano y 7,5 % DMSO u otros medios de congelación celular adecuados que contengan, por ejemplo, Hesperan y PlasmaLyte A, las células se congelan entonces a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Pueden utilizarse otros procedimientos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20° C o en nitrógeno líquido.

20 Como se describe en el presente documento, las células criopreservadas se descongelan y se lavan como se describe en el presente documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación mediante los procedimientos de la presente divulgación.

También se contempla en el contexto de la divulgación la recogida de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un periodo de tiempo anterior a cuando las células expandidas como se describe en el presente documento podrían ser necesarias. Como tal, la fuente de las células a expandir puede ser recogida en cualquier momento necesario, y las células deseadas, como las células T, aisladas y congeladas para su posterior uso en la terapia de células T para cualquier número de enfermedades o condiciones que se beneficiarían de la terapia de células T, como las descritas en este documento. Como se describe en este documento, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. Como se describe en el presente documento, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que corre el riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés se aíslan y congelan para su uso posterior. Como se describe en el presente documento, las células T pueden expandirse, congelarse y utilizarse posteriormente. Como se describe en el presente documento, las muestras se recogen de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular como se describe en el presente documento, pero antes de cualquier tratamiento. Como se describe en el presente documento, las células se aíslan a partir de una muestra de sangre o de una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento pertinentes, incluyendo, pero sin limitarse a ello, el tratamiento con agentes como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación agentes inmunosupresores, como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoblivos como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxan, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente del calcio, la calcineurina (ciclosporina y FK506), o inhiben la quinasa p70S6, importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina). (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). Como se describe en el presente documento, las células se aíslan para un paciente y se congelan para su uso posterior junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) el trasplante de médula ósea o de células madre, la terapia ablativa de células T utilizando agentes quimioterapéuticos como la fludarabina, la radioterapia de haz externo (XRT), la ciclofosfamida o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. Como se describe en el presente documento, las células se aíslan antes y se pueden congelar para su uso posterior para el tratamiento después de la terapia ablativa de células B, como los agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan.

50 Como se describe en el presente documento, las células T se obtienen de un paciente directamente después de un tratamiento que deja al sujeto con células T funcionales. A este respecto, se ha observado que tras ciertos tratamientos contra el cáncer, en particular los tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento, durante el período en que los pacientes normalmente se estarían recuperando del mismo, la calidad de las células T obtenidas puede ser óptima o mejorada para su capacidad de expansión *ex vivo*. Asimismo, tras la manipulación *ex vivo* mediante los procedimientos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferente para mejorar el injerto y la expansión *in vivo*. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente divulgación recoger células sanguíneas, incluyendo células T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, la movilización (por ejemplo, la movilización con GM-CSF) y los regímenes de acondicionamiento pueden utilizarse para crear una condición en un sujeto en la que se favorezca la repoblación, la recirculación, la regeneración y/o la expansión de determinados tipos de células, especialmente durante una ventana de tiempo definida tras la terapia. Algunos tipos de células ilustrativas son las células T, las células B, las células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

Como se describe en el presente documento, las células efectoras inmunitarias que expresan una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento, se obtienen de un sujeto que ha recibido una dosis baja y potenciadora de la inmunidad de un inhibidor de mTOR. Como se describe en el presente documento, la población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, que se van a diseñar para que expresen un CAR, se recolectan después de un tiempo suficiente, o después de una dosis suficiente de un inhibidor de mTOR que mejora el sistema inmunitario, de manera que el nivel de células efectoras inmunitarias negativas a PD1, por ejemplo, células T, o la relación de células efectoras inmunitarias negativas a PD1/ células T positivas a PD1, en el sujeto o recolectado del sujeto ha sido Células T, o la relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T/ células efectoras inmunitarias PD1 positivas, por ejemplo, células T, en el sujeto o recolectadas del sujeto ha sido, al menos transitoriamente, aumentada.

Como se describe en el presente documento, la población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, que tienen o serán diseñadas para expresar un CAR, pueden ser tratadas *ex vivo* por contacto con una cantidad de un inhibidor de mTOR que aumenta el número de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T o aumenta la relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T/ células efectoras inmunitarias PD1 positivas, por ejemplo, células T.

Como se describe en el presente documento, una población de células T es deficiente en diaclicerol quinasa (DGK). Las células deficientes en DGK incluyen células que no expresan el ARN o la proteína DGK, o que tienen una actividad de DGK reducida o inhibida. Las células deficientes en DGK pueden generarse mediante enfoques genéticos, por ejemplo, administrando agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, ARNip, ARNhc, miARN, para reducir o impedir la expresión de DGK. Alternativamente, se pueden generar células deficientes en DGK mediante el tratamiento con los inhibidores de DGK descritos en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, una población de células T es deficiente en Ikaros. Las células deficientes de Ikaros incluyen células que no expresan el ARN o la proteína de Ikaros, o que tienen una actividad de Ikaros reducida o inhibida, las células deficientes de Ikaros pueden generarse mediante enfoques genéticos, por ejemplo, administrando agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, ARNsi, ARNhc, miARN, para reducir o impedir la expresión de Ikaros. Alternativamente, se pueden generar células deficientes en Ikaros mediante el tratamiento con inhibidores de Ikaros, por ejemplo, lenalidomida.

Como se describe en el presente documento, una población de células T es deficiente en DGK e Ikaros, por ejemplo, no expresa DGK e Ikaros, o tiene una actividad reducida o inhibida de DGK e Ikaros. Dichas células deficientes en DGK e Ikaros pueden generarse mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, las células NK se obtienen del sujeto. Como se describe en el presente documento, las células NK son una línea celular NK, por ejemplo, la línea celular NK-92 (Conkwest).

Células efectoras inmunitarias CAR alogénicas

Como se describe en el presente documento, la célula efectora inmunitaria puede ser una célula efectora inmunitaria alogénica, por ejemplo, una célula T o una célula NK. Por ejemplo, la célula puede ser una célula T alogénica, por ejemplo, una célula T alogénica que carece de expresión de un receptor de células T (TCR) funcional y/o de un antígeno leucocitario humano (HLA), por ejemplo, HLA clase I y/o HLA clase II.

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

Una célula T descrita en el presente documento puede ser, por ejemplo, diseñada de manera que no exprese un HLA funcional en su superficie. Por ejemplo, una célula T descrita en el presente documento, puede ser diseñada de tal manera que la expresión de la superficie celular HLA, por ejemplo, HLA clase I y/o HLA clase II, sea regulada a la baja. En algunos aspectos, la regulación a la baja del HLA puede lograrse reduciendo o eliminando la expresión de la microglobulina beta-2 (B2M).

Como se describe en el presente documento, la célula T puede carecer de un TCR funcional y un HLA funcional, por ejemplo, HLA clase I y/o HLA clase II.

Las células T modificadas que carecen de la expresión de un TCR y/o HLA funcional pueden obtenerse por cualquier medio adecuado, incluyendo un knock out o derribo de una o más subunidad del TCR o HLA. Por ejemplo, la célula T puede incluir un derribo del TCR y/o del HLA utilizando ARNsi, ARNhc, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interesparadas con regularidad repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interesparadas

(CRISPR), nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN) o endonucleasas de dedos de zinc (ZFN).

Como se describe en el presente documento, la célula alogénica puede ser una célula que no expresa o expresa a niveles bajos una molécula inhibidora, por ejemplo, por cualquier procedimiento descrito en el presente documento. Por ejemplo, la célula puede ser una célula que no exprese o que exprese a niveles bajos una molécula inhibidora, por ejemplo, que pueda disminuir la capacidad de una célula que exprese CAR para montar una respuesta inmune efector. Algunos ejemplos de moléculas inhibidoras son PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta. La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo, mediante la inhibición a nivel de ADN, ARN o proteínas, puede optimizar el rendimiento de una célula que exprese CAR. Como se describe en el presente documento, se puede utilizar un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un ARNbc, por ejemplo, un ARNip o ARNhc, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas con regularidad (CRISPR), nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN), o un zinc finger endonuclease (ZFN), por ejemplo, como se describe en el presente documento.

ARNip y ARNhc para inhibir el TCR o el HLA

Como se describe en el presente documento, la expresión del TCR y/o la expresión del HLA puede inhibirse utilizando ARNsi o ARNhc que se dirige a un ácido nucleico que codifica un TCR y/o HLA, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta), en una célula.

La expresión de ARNsi y ARNhc en células T puede lograrse utilizando cualquier sistema de expresión convencional, por ejemplo, como un sistema de expresión lentiviral.

Se describen ARNhc ejemplares que regulan la expresión de uno o más componentes del TCR, por ejemplo, en Publicación de EE.UU. No: 2012/0321667. Se describen ejemplos de ARNsi y ARNhc que regulan la expresión de los genes HLA de clase I y/o HLA de clase II, por ejemplo, en la publicación estadounidense No: US 2007/0036773.

CRISPR para inhibir el TCR o el HLA

"CRISPR" o "CRISPR para TCR y/o HLA" o "CRISPR para inhibir TCR y/o HLA", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas con regularidad, o a un sistema que comprende dicho conjunto de repeticiones. "Cas", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína asociada a CRISPR. Un sistema "CRISPR/Cas" se refiere a un sistema derivado de CRISPR y Cas que puede utilizarse para silenciar o mutar un gen TCR y/o HLA, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta).

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

El sistema CRISPR/Cas ha sido modificado para su uso en la edición de genes (silenciando, mejorando o cambiando genes específicos) en eucariotas como ratones o primates. Wiedenheft et al. (2012) Nature 482: 331-8. Esto se consigue introduciendo en la célula eucariota un plásmido que contiene un CRISPR específicamente diseñado y uno o más Cas adecuados.

La secuencia CRISPR, a veces llamada locus CRISPR, comprende repeticiones alternas y espaciadores. En un CRISPR de origen natural, los espaciadores suelen comprender secuencias ajenas a la bacteria, como un plásmido o una secuencia de fago; en el sistema CRISPR/Cas de TCR y/o HLA, los espaciadores se derivan de la secuencia del gen TCR o HLA.

El ARN del locus CRISPR es expresado constitutivamente y procesado por las proteínas Cas en pequeños ARNs. Estos comprenden un espaciador flanqueado por una secuencia repetida. Los ARN guían a otras proteínas Cas para silenciar elementos genéticos exógenos a nivel de ARN o ADN. Horvath et al. (2010) Ciencia 327: 167-170 Makarova et al. (2006) Biology Direct 1: 7. Los espaciadores sirven así de plantillas para las moléculas de ARN, de forma análoga a los ARNsi. Pennisi (2013) Ciencia 341: 833-836.

Como éstas se dan de forma natural en muchos tipos diferentes de bacterias, las disposiciones exactas del CRISPR y la estructura, función y número de genes Cas y su producto difieren un poco de una especie a otra. Haft et al. (2005) PLoS Comput. Biol. 1: e60 Kunin et al. (2007) Genome Biol. 8: R61 Mojica et al. (2005) J. Mol. Evol. 60: 174-182;

Bolotin et al. (2005) *Microbiol.* 151: 2551-2561; Pourcel et al. (2005) *Microbiol.* 151: 653-663y Stern et al. (2010) *Tendencias. Genet.* 28: 335-340. Por ejemplo, las proteínas Cse (subtipo Cas, *E. coli*) (por ejemplo, CasA) forman un complejo funcional, Cascade, que procesa los transcritos de ARN CRISPR en unidades de repetición de espaciadores que Cascade retiene. Brouns et al. (2008) *Science* 321: 960-964. En otros procariontes, Cas6 procesa el transcrito CRISPR. La inactivación de fagos basada en CRISPR en *E. coli* requiere Cascade y Cas3, pero no Cas1 o Cas2. Las proteínas Cmr (módulo Cas RAMP) en *Pyrococcus furiosus* y otros procariontes forman un complejo funcional con pequeños ARN CRISPR que reconoce y escinde ARNs diana complementarios. Un sistema CRISPR más sencillo se basa en la proteína Cas9, que es una nucleasa con dos sitios de escisión activos, uno para cada hebra de la doble hélice. La combinación de Cas9 y el ARN del locus CRISPR modificado puede utilizarse en un sistema de edición de genes. Pennisi (2013) *Ciencia* 341: 833-836.

El sistema CRISPR/Cas puede así ser utilizado para editar un gen TCR y/o HLA (añadiendo o eliminando un par de bases), o introduciendo una parada prematura que disminuye así la expresión de un TCR y/o HLA. El sistema CRISPR/Cas puede utilizarse alternativamente como ARN de interferencia, desactivando el TCR y/o el gen HLA de forma reversible. En una célula de mamífero, por ejemplo, el ARN puede guiar a la proteína Cas hacia un promotor del TCR y/o del HLA, bloqueando estéricamente las ARN polimerasas.

Se pueden generar sistemas CRISPR/Cas artificiales que inhiban el TCR y/o el HLA, utilizando tecnología conocida en la técnica, por ejemplo, la descrita en Publicación de EE.UU. nº 20140068797 and Cong (2013) *Science* 339: 819-823. También pueden generarse otros sistemas CRISPR/Cas artificiales conocidos en la técnica que inhiben el TCR y/o el HLA, por ejemplo, el descrito en Tsai (2014) *Nature Biotechnol.* 32:6 569-576, Patente de EE.UU. nº: 8,871,445 8,865,406 8,795,965 8,771,945y 8,697,359.

TALEN para inhibir el TCRy/o el HLA

"TALEN" o "TALEN para HLA y/o TCR" o "TALEN para inhibir HLA y/o TCR" se refiere a una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción, una nucleasa artificial que puede utilizarse para editar el gen HLA y/o TCR, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta).

Las TALENs son producidas artificialmente fusionando un dominio de unión al ADN del efector TAL con un dominio de corte del ADN. Los efectos similares a los activadores de la transcripción (TALEs) pueden ser diseñados para unirse a cualquier secuencia de ADN deseada, incluyendo una porción del gen HLA o TCR. Combinando una TALE de ingeniería con un dominio de corte de ADN, se puede producir una enzima de restricción que sea específica para cualquier secuencia de ADN deseada, incluyendo una secuencia HLA o TCR. A continuación, pueden introducirse en una célula, donde pueden utilizarse para la edición del genoma. Boch (2011) *Nature Biotech.* 29: 135-6y Boch et al. (2009) *Science* 326: 1509-12; Moscou et al. (2009) *Science* 326: 3501.

Las TALEs son proteínas secretadas por las bacterias *Xanthomonas*. El dominio de unión al ADN contiene una secuencia repetida de 33-34 aminoácidos altamente conservada, con la excepción de los aminoácidos 12 y 13. Estas dos posiciones son muy variables, mostrando una fuerte correlación con el reconocimiento de nucleótidos específicos. De este modo, pueden diseñarse para que se unan a la secuencia de ADN deseada.

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

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

Una TALEN HLA o TCR puede ser usada dentro de una célula para producir una ruptura de doble cadena (DSB). Se puede introducir una mutación en el lugar de la rotura si los mecanismos de reparación reparan incorrectamente la rotura mediante la unión de extremos no homólogos. Por ejemplo, una reparación incorrecta puede introducir una mutación de cambio de marco. Alternativamente, se puede introducir ADN extraño en la célula junto con el TALEN; dependiendo de las secuencias del ADN extraño y de la secuencia cromosómica, este proceso puede utilizarse para corregir un defecto en el gen HLA o TCR o introducir dicho defecto en un gen HLA o TCR wt, disminuyendo así la expresión de HLA o TCR.

Las TALENs específicas para secuencias en HLA o TCR pueden ser construidas usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo varios esquemas usando componentes modulares. Zhang et al. (2011) Nature Biotech. 29: 149-53 Geibler et al. (2011) PLoS ONE 6: e19509.

Nucleasa de dedo de zinc para inhibir el HLA y/o el TCR

5 "ZFN" o "nucleasa de dedos de zinc" o "ZFN para HLA y/o TCR" o "ZFN para inhibir HLA y/o TCR" se refieren a una nucleasa de dedos de zinc, una nucleasa artificial que puede utilizarse para editar el gen HLA y/o TCR, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta).

10 Al igual que una TALEN, un ZFN comprende un dominio de nucleasa FokI (o un derivado del mismo) fusionado a un dominio de unión al ADN. En el caso de un ZFN, el dominio de unión al ADN comprende uno o más dedos de zinc. Carroll et al. (2011) Sociedad de Genética de América 188: 773-782y Kim et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1156-1160.

15 Un dedo de zinc es un pequeño motivo estructural proteico estabilizado por uno o más iones de zinc. Un dedo de zinc puede comprender, por ejemplo, Cys2His2, y puede reconocer una secuencia de aproximadamente 3 pb. Pueden combinarse varios dedos de zinc de especificidad conocida para producir polipéptidos de dedos múltiples que reconozcan secuencias de 6, 9, 12, 15 o 18 pb aproximadamente. Existen varias técnicas de selección y ensamblaje modular para generar dedos de zinc (y combinaciones de los mismos) que reconozcan secuencias específicas, entre
20 las que se incluyen la visualización de fagos, los sistemas de levadura de un híbrido, los sistemas bacterianos de un híbrido y de dos híbridos, y las células de mamíferos.

Como una TALEN, un ZFN debe dimerizarse para escindir el ADN. Por lo tanto, se requiere un par de ZFNs para dirigirse a sitios de ADN no palindrómico. Los dos ZFN individuales deben unirse a hebras opuestas del ADN con sus nucleasas debidamente espaciadas. Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10570-5.

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

30 Los ZFNs específicos para secuencias en HLA Y/O TCR pueden ser construidos usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Cathomen et al. (2008) Mol. Ther. 16: 1200-7; Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 400: 96 Publicación de la patente estadounidense 2011/0158957y Publicación de la patente estadounidense 2012/0060230.

Expresión de la telomerasa

35 Sin querer estar atado a ninguna teoría en particular, una célula T terapéutica tiene una persistencia a corto plazo en un paciente, debido a los telómeros acortados en la célula T; en consecuencia, la transfección con un gen de telomerasa puede alargar los telómeros de la célula T y mejorar la persistencia de la célula T en el paciente. Véase Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007). Así, en un caso, una célula efectora inmune, por ejemplo, una célula T, expresa ectópicamente una subunidad de telomerasa, por ejemplo, la subunidad catalítica de la telomerasa, por ejemplo, TERT, por ejemplo, hTERT. En algunos casos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir una célula que exprese CAR, que
40 comprende poner en contacto una célula con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, por ejemplo, la subunidad catalítica de la telomerasa, por ejemplo, TERT, por ejemplo, hTERT. La célula puede ser puesta en contacto con el ácido nucleico antes, simultáneamente o después de ser puesta en contacto con un constructo que codifica un CAR.

45 En un caso, la divulgación presenta un procedimiento para hacer una población de células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NK). Como se describe en el presente documento, el procedimiento comprende: proporcionar una población de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T o células NK), poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica un CAR; y poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, por ejemplo, hTERT, en condiciones que permiten la expresión de CAR y telomerasa.

50 Como se describe en el presente documento, el ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa es ADN. Como se describe en el presente documento, el ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa comprende un promotor capaz de impulsar la expresión de la subunidad de telomerasa.

55 Como se describe en el presente documento, hTERT tiene la secuencia de aminoácidos de GenBank Protein ID AAC51724.1 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795) como sigue:

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAFALVAQCLVCV
 PWDARPPPAAPFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTT
 SVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPL
 YQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGASASRLP
 LPKRPRRGAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPARPAEEATSLEGALSGT
 RSHSPVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPS
 LTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTH
 CPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPEEEDTDPRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLR
 RLVPGLWGRHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRGCAWLRRSPGVGC
 VPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRLLFFYRKS VWSKLQSI
 GIRQHLKRVQLRELSAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNM DYVVGARTFRR
 EKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRWRTFVLRVRAQDPPPEL
 YFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPNQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVST
 LTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKS
 YVQCQGPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFL
 RTLVRGVPEYGCVVNLKRTVVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEV
 QSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNI
 YKILLLQAYRFHACVLQLPFHQQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKG
 AAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAA
 NPALPSDFKTILD (SEQ ID NO: 61)

5 Como se describe en el presente documento, el hTERT tiene una secuencia al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96[^], 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 61. Como se describe en el presente documento, el hTERT tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 61. Como se describe en el presente documento, el hTERT comprende una delección (por ejemplo, de no más de 5, 10, 15, 20 o 30 aminoácidos) en el N-terminal, el C-terminal, o ambos. En una realización, el hTERT comprende una secuencia de aminoácidos transgénica (por ejemplo, de no más de 5, 10, 15, 20 o 30 aminoácidos) en el N-terminal, el C-terminal, o ambos.

10 Como se describe en el presente documento, el hTERT está codificado por la secuencia de ácido nucleico de GenBank Accession No. AF018167 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795)

1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc
 61 cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgctgct ccctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc
 121 tgccgctggc cacgttctg cggcgcctgg gggcccaggc ctggcggctg gtgcagcgcg
 181 gggaccggc ggctttccgc gcgctggtgg cccagtgcct ggtgtgctg cctgggacg
 241 cacggccgcc ccccgccgcc cctccttcc gccaggtgct ctgctgaag gagctggtg
 301 cccgagtct gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcgcttgc
 361 cgctgctgga cggggccgc gggggcccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct
 421 acctgccaa cacggtgacc gacgcactgc gggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttgc
 481 gccgcgtggg cgacgacgtg ctggtcacc tgctggcagc ctgcgcgctc tttgtctgg

ES 2 891 332 T3

541 tggctcccag ctgcgcctac caggtgtgcg ggccgccgct gtaccagctc ggcgctgcca
601 ctcaggcccc gcccccgcca cacgctagtg gaccccgaaag gcgctctggga tgcgaacggg
661 cctggaacca tagcgtcagg gaggccgggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtgcca
721 ggaggcgagg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttccc caagaggccc aggcgtggcg
781 ctgcccctga gccggagcgg acgcccgttg ggcaggggtc ctgggccac ccgggcagga
841 cgcgtggacc gaggaccgt ggttctgtg tgggtcacc tgccagacc gccgaagaag
901 ccacctttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacctatcc gtgggccgcc
961 agcaccacgc gggccccca tccacatcgc ggcaccacg tcctgggac acgccttgc
1021 ccccggtgta gccggagacc aagcacttc tctactcctc aggcgacaag gacagctgc
1081 ggccctcctt cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgtcgg aggcctgtg
1141 agacctttt tctgggttcc aggcctgga tgccagggac tccccgagg ttccccgcc
1201 tgccccagcg ctactggcaa atcgggcccc tgttctgga gctgctggg aaccacgcg
1261 agtccccca cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgtc gcgagctgcg gtcacccag
1321 cagccggtgt ctgtccccg gagaaagccc agggctctgt ggcggcccc gagaggagg
1381 acacagacc cgtcgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagccc tggcaggtg
1441 acggcttctg cggggcctgc ctgcgccgc tgggtcccc aggcctctgg ggtccaggc
1501 acaacgaacg ccgcttctc aggaacacca agaagtcat ctccctgggg aagcatgcca
1561 agctctcgtg gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtcgg gggctgcgct tggctgcga
1621 ggagcccagg ggtggctgt gttccggccg cagagcaccg tctcgtgag gagatcctgg
1681 ccaagtctc gactggctg atgagtgtg acgtcctcga gctgctcagg tctttttt
1741 atgtcacgga gaccacgtt caaaagaaca ggctctttt ctaccggaag agtgtctgga
1801 gcaagtgca aagcattgga atcagacagc actgaaagag ggtgcagctg cgggagctg
1861 cggaaacaga ggtcaggcag catcggaag ccaggcccc cctgctgacg tccagactc
1921 gttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gctgtgggag
1981 ccagaacgtt ccgagagaa aagaggccg agcgtctcac ctgagggtg aaggcactgt
2041 tcagcgtgct caactacgag cgggcgccc gccccggcct cctgggccc tctgtgctg
2101 gcctggacga tatccagag gcctggcga cctcgtgct gcgtgtcgg gcccaggacc
2161 cggccctga gctgtactt gtcaaggtg atgtgacggg cgcgtacgac accatcccc
2221 aggacaggt cacggagtc atgccagca tcatcaaac ccagaacacg tactgcgtgc
2281 gtcggtatgc cgtgtccag aaggccccc atggcacgt ccgcaaggcc ttcaagacc
2341 acgtctctac ctgacagac ctccagcct acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg

2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctctccctg aatgaggcca
 2461 gcagtgccct ctccagctc ttctacgct tcatgtgcca ccacgccgtg cgcatcaggg
 2521 gcaagtcta cgtccagtgc caggggatcc cgcagggctc catctctcc acgtctctt
 2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc
 2641 tgctcctcgc ttgttgatg gattttgtt tggtagacc tcacctacc cacgcgaaaa
 2701 cttctcag gaccctggc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtggg aacttgcgga
 2761 agacagtggg gaattcctt gtagaagacg aggccctggg tggcacggct tttgtcaga
 2821 tgccggccca cggcctattc ccctgggtgc gcctgctgct ggataccgg accctggagg
 2881 tgacagcga ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc acctcaacc
 2941 gcggctcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaacctt tggggcttg cggctgaagt
 3001 gtcacagcct tttctggat ttgaggtga acagcctcca gacgggtgtc accaacatct
 3061 acaagatcct cctgctcag gcgtacaggt ttacgcagc tgtgctcag ctcccattc
 3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacattt tctgcgcgt catctctgac acggcctccc
 3181 tctgtactc catctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctggggcc aagggcggc
 3241 ccggcctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc
 3301 tgactcgaca ccgtgcacc tacgtgccac tctggggtc actcaggaca gccagacgc
 3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg
 3421 cactgcccct agactcaag accatcctgg actgatggcc acccgccac agccaggccg
 3481 agagcagaca ccagcagccc tgcacgccg ggctctacgt cccaggagg gagggcgggc
 3541 ccacaccag gcccgaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgttg gccgagcct
 3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaaggc
 3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtttact tccccacag ctggcgctc gctccacc
 3721 agggccagct tttctcacc aggagccgg cttcactcc ccatagga atagtccatc
 3781 cccagattcg ccattgtca ccctcgccc tgcctctt tgcctccac cccaccatc
 3841 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctggaa ttggagtga ccaaagggt
 3901 gcctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattggg
 3961 ggaggtgctg tgggagtaa atactgaata tatgagttt tcagtttga aaaaaaaaa
 4021 aaaaaa (SEQ ID NO: 62)

Como se describe en el presente documento, la hTERT está codificada por un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 62. Como se describe en el presente documento, el hTERT está codificado por un ácido nucleico de la SEQ ID NO: 62.

5 ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS

Las células pueden activarse y expandirse generalmente utilizando procedimientos como los descritos, por ejemplo, en Patentes de EE.UU. 6.352.694 6,534,055 6,905,680 6,692,964 5,858,358 6,887,466 6,905,681 7,144,575 7,067,318 7,172,869 7,232,566 7,175,843 5,883,223 6,905,874 6,797,514 6,867,041 y Publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20060121005.

- 10 Generalmente, las células T de la divulgación se expanden por contacto con una superficie que tiene adherido un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. En particular, las poblaciones de células T pueden estimularse como se describe en el presente documento, como por ejemplo por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de la proteína quinasa C (por ejemplo, brioestatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en
- 15

condiciones adecuadas para estimular la proliferación de las células T. Para estimular la proliferación de células T CD4+ o células T CD8+, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Entre los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 se incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besançon, Francia), así como otros procedimientos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998 Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999 Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

Como se describe en el presente documento, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para la célula T pueden ser proporcionadas por diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden estar acoplados a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Alternativamente, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. Como se describe en el presente documento, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. Como se describe en este documento, ambos agentes pueden estar en solución. Como se describe en el presente documento, los agentes pueden estar en forma soluble, y luego reticulados a una superficie, como una célula que exprese receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. A este respecto, véase por ejemplo La publicación de la solicitud de patente de EE.UU. nº 20040101519 y 20060034810 para las células presentadoras de antígeno artificiales (aAPCs) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de las células T en la presente divulgación.

Como se describe en el presente documento, los dos agentes se inmovilizan en perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o en perlas separadas, es decir, "trans" A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes se co-inmovilizan a la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. Como se describe en el presente documento, se utiliza una relación de 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para la expansión de células T CD4+ y el crecimiento de células T. En ciertos casos de la presente divulgación, se utiliza una relación de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las perlas tal que se observa un aumento de la expansión de células T en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un caso particular se observa un aumento de aproximadamente 1 a 3 veces en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. Como se describe en el presente documento, la relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas oscila entre 100:1 y 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un caso de la presente divulgación, se une más anticuerpo anti-CD28 a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es inferior a uno. En ciertos casos de la divulgación, la relación del anticuerpo anti CD28 con respecto al anticuerpo anti CD3 unido a las perlas es superior a 2:1. En un caso particular, se utiliza una relación 1:100 de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas. En otro caso, se utiliza una relación 1:75 de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas. En otro caso, se utiliza una relación 1:50 de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas. En otro caso, se utiliza una relación 1:30 de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas. En un caso, se utiliza una relación 1:10 de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas. En otro caso, se utiliza una relación 1:3 de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas. En otro caso, se utiliza una relación 3:1 de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas.

Para estimular las células T u otras células diana pueden utilizarse relaciones de partículas a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero intermedio. Como los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente, la relación de partículas con respecto a las células puede depender del tamaño de las partículas en relación con la célula diana. Por ejemplo, las perlas de tamaño pequeño sólo podrían unir unas pocas células, mientras que las perlas más grandes podrían unir muchas. En ciertas realizaciones, la relación entre células y partículas oscila entre 1:100 y 100:1 y cualquier valor entero intermedio, y en otras realizaciones, la relación comprende entre 1:9 y 9:1 y cualquier valor entero intermedio, también puede utilizarse para estimular las células T. La relación de partículas acopladas a anti-CD3 y anti-CD28 con respecto a las células T que dan lugar a la estimulación de las células T puede variar como se ha indicado anteriormente, sin embargo, ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, y 15:1 con una relación preferida de al menos 1:1 partículas por célula T. Como se describe en este documento, se utiliza una relación de partículas a células de 1:1 o menos. Como se describe en el presente documento, una relación preferida de partículas: células es de 1:5. En otros casos, la relación entre partículas y células puede variar en función del día de estimulación. Por ejemplo, la relación de partículas con respecto a las células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células cada día o cada dos días a partir de entonces durante un máximo de 10 días, en relaciones finales de 1:1 a 1:10 (basadas en los recuentos de células el día de la adición). En un caso particular, la relación entre partículas y células es de 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En otro, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta alcanzar una relación final de 1:1 el primer día, y de 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En otro caso, la relación entre partículas y células es de 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. En otro caso, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día, y de 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. Un experto en la materia apreciará que una variedad de otras relaciones puede ser adecuada para su uso en la presente divulgación. En particular, las relaciones variarán en función del tamaño de las partículas y del tamaño y tipo de células. Tal y como se describe en el presente documento, las relaciones más típicas de uso se sitúan en torno a 1:1, 2:1 y 3:1 el primer día.

Como se describe en el presente documento, las células, como las células T, se combinan con perlas recubiertas de agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y luego las células se cultivan. Como se describe en este documento, antes del cultivo, las perlas recubiertas de agente y las células no se separan, sino que se cultivan juntas. Como se describe en el presente documento, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, como por ejemplo una fuerza magnética, lo que da lugar a un aumento de la ligadura de los marcadores de la superficie celular, induciendo así la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que se unen anti-CD3 y anti-CD28 (perlas 3x28) entren en contacto con las células T. En una realización, las células (por ejemplo, de 10⁴ a 10⁹ células T) y las microesferas (por ejemplo, las microesferas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T en una relación de 1:1) se combinan en un tampón, por ejemplo PBS (sin cationes divalentes como el calcio y el magnesio). Una vez más, los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente que se puede utilizar cualquier concentración de células. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender sólo el 0,01 % de la muestra o toda la muestra (*es decir*, el 100 %) puede comprender la célula diana de interés. En consecuencia, cualquier número de célula está dentro del contexto de la presente divulgación. Como se describe en el presente documento, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las partículas y las células (*es decir*, aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las partículas. Por ejemplo, se utiliza una concentración de unos 2.000 millones de células/ml. Como se describe en este documento, se utilizan más de 100 millones de células/ml. Como se describe en el presente documento, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. Como se describe en el presente documento, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. Tal como se describe en el presente documento, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de concentraciones elevadas puede dar lugar a un mayor rendimiento celular, a la activación de las células y a su expansión. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de las células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, como las células T CD28-negativas. Estas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en ciertas realizaciones. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de las células T CD8+ que normalmente tienen una expresión más débil de CD28.

Como se describe en el presente documento, las células transducidas con un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo, un NKR-CAR descrito en el presente documento, se expanden, por ejemplo, mediante un procedimiento descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, las células se expanden en cultivo durante un periodo de varias horas (por ejemplo, unas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 horas) a unos 14 días (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días). Como se describe en este documento, las células se expanden durante un período de 4 a 9 días. Como se describe en el presente documento, las células se expanden durante un período de 8 días o menos, por ejemplo, 7, 6 o 5 días. Como se describe en el presente documento, las células, por ejemplo, una célula NKR-CAR descrita en el presente documento, se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. La potencia puede definirse, por ejemplo, por diversas funciones de las células T, como la proliferación, la eliminación de células diana, la producción de citoquinas, la activación, la migración o combinaciones de las mismas. Como se describe en el presente documento, las células, por ejemplo, una célula NKR-CAR descrita en el presente documento, expandidas durante 5 días muestran al menos un aumento de una, dos, tres o cuatro veces en la duplicación de las células tras la estimulación del antígeno en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. Como se describe en el presente documento, las células, por ejemplo, las células que expresan un NKR-CAR descrito en el presente documento, se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes muestran una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, niveles de IFN- γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. Como se describe en el presente documento, las células, por ejemplo, una célula NKR-CAR descrita en el presente documento, expandidas durante 5 días muestran al menos un aumento de uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez veces o más en pg/ml de producción de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, niveles de IFN- γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo.

Como se describe en el presente documento, la mezcla puede ser cultivada durante varias horas (aproximadamente 3 horas) hasta aproximadamente 14 días o cualquier valor entero horario entre ambos. Como se describe en este documento, la mezcla puede cultivarse durante 21 días. Como se describe en este documento, las perlas y las células T se cultivan juntas durante unos ocho días. En otra realización, las perlas y las células T se cultivan juntas durante 2-3 días. También se pueden desear varios ciclos de estimulación, de manera que el tiempo de cultivo de las células T puede ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (*por ejemplo*, Medio Esencial Mínimo o Medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de las células conocido por la persona experimentada. Otros aditivos para el crecimiento de las células incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos, plasmanato y agentes reductores como la N-acetil-cisteína y el 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato sódico y vitaminas, ya sea sin suero o complementado con una cantidad adecuada

de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citoquina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de las células T. Los antibióticos, por ejemplo, la penicilina y la estreptomycin, se incluyen sólo en los cultivos experimentales, no en los cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (*por ejemplo*, 37° C) y una atmósfera (por ejemplo, aire más 5 % de CO₂).

Como se describe en el presente documento, las células se expanden en un medio apropiado (por ejemplo, el medio descrito en el presente documento) que incluye una o más interleucinas que dan como resultado un aumento de al menos 200 veces (por ejemplo, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces) en las células durante un período de expansión de 14 días, por ejemplo, según lo medido por un procedimiento descrito en el presente documento, como la citometría de flujo. Como se describe en el presente documento, las células se expanden en presencia de IL-15 y/o IL-7 (por ejemplo, IL-15 e IL-7).

Como se describe en el presente documento, los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo, los procedimientos de fabricación de células que expresan CAR, comprenden la eliminación de células reguladoras T, por ejemplo, células T CD25+, de una población celular, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25, IL-2. En el presente documento se describen procedimientos para eliminar células reguladoras T, por ejemplo, células T CD25+, de una población celular. Como se describe en el presente documento, los procedimientos, por ejemplo, los procedimientos de fabricación, comprenden además el contacto de una población celular (por ejemplo, una población celular en la que se han agotado las células reguladoras T, como las células T CD25+, o una población celular que se ha puesto en contacto previamente con un anticuerpo anti-CD25, un fragmento del mismo o un ligando de unión a CD25) con IL-15 y/o IL-7. Por ejemplo, la población de células (por ejemplo, que se ha puesto en contacto previamente con un anticuerpo anti-CD25, un fragmento del mismo o un ligando de unión a CD25) se expande en presencia de IL-15 y/o IL-7.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido de interleucina-15 (IL-15), un polipéptido del receptor de interleucina-15 alfa (IL-15Ra), o una combinación de ambos, un polipéptido de IL-15 y un polipéptido de IL-15Ra, por ejemplo, hetIL-15, durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, *ex vivo*. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido IL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, *ex vivo*. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende una combinación de un polipéptido IL-15 y un polipéptido IL-15 Ra durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, *ex vivo*. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende hetIL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, *ex vivo*.

Como se describe en el presente documento, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende hetIL-15 durante la expansión *ex vivo*. Como se describe en el presente documento, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido IL-15 durante la expansión *ex vivo*. Como se describe en el presente documento, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende tanto un polipéptido de IL-15 como un polipéptido de IL-15Ra durante la expansión *ex vivo*. Como se describe en el presente documento, el contacto da lugar a la supervivencia y proliferación de una subpoblación de linfocitos, por ejemplo, células T CD8+.

Las células T que han sido expuestas a tiempos de estimulación variados pueden presentar características diferentes. Por ejemplo, los productos típicos de células mononucleares de sangre periférica o de aféresis tienen una población de células T auxiliares (T_H, CD4+) mayor que la población de células T citotóxicas o supresoras (T_C, CD8+). La expansión *ex vivo* de las células T mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que antes de los días 8-9 aproximadamente está formada predominantemente por células T_H, mientras que después de los días 8-9 aproximadamente, la población de células T comprende una población cada vez mayor de células T_C. En consecuencia, dependiendo del propósito del tratamiento, puede ser ventajoso infundir a un sujeto con una población de células T compuesta predominantemente por células T_H. Del mismo modo, si se ha aislado un subconjunto de células T_C específicas de antígeno, puede ser beneficioso ampliar este subconjunto en mayor medida.

Además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de forma reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, dicha reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de células T activadas para fines específicos.

Alternativamente, o en combinación con los procedimientos divulgados en el presente documento, se divulgan procedimientos y composiciones para uno o más de: detección y/o cuantificación de células que expresan CAR (*por ejemplo, in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, monitoreo clínico)); expansión y/o activación de células inmunes; y/o selección específica de CAR, que implican el uso de un ligando CAR. Como se describe en el presente documento, el ligando de CAR es un anticuerpo que se une a la molécula de CAR, por ejemplo, se une al dominio extracelular de unión a antígeno de CAR (por ejemplo, un anticuerpo que se une al dominio de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo antiidiotípico; o un anticuerpo que se une a una región constante del dominio extracelular de unión). Como se describe

en el presente documento, el ligando CAR es una molécula de antígeno CAR (por ejemplo, una molécula de antígeno CAR como se describe en el presente documento).

En un caso, se proporciona un procedimiento para detectar y/o cuantificar las células que expresan CAR. Por ejemplo, el ligando CAR puede utilizarse para detectar y/o cuantificar las células que expresan CAR *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, la monitorización clínica de las células que expresan CAR en un paciente, o la dosificación de un paciente). El procedimiento incluye:

proporcionar el ligando CAR (opcionalmente, un ligando CAR etiquetado, por ejemplo, un ligando CAR que incluye una etiqueta, una perla, una etiqueta radiactiva o fluorescente);

adquirir la célula que expresa CAR (por ejemplo, adquirir una muestra que contenga células que expresan CAR, como una muestra de fabricación o una muestra clínica);

poner en contacto la célula que expresa el CAR con el ligando del CAR en condiciones en las que se produce la unión, detectando así el nivel (por ejemplo, la cantidad) de las células que expresan el CAR presentes. La unión de la célula que expresa el CAR con el ligando del CAR puede detectarse mediante técnicas estándar como FACS, ELISA y similares.

En otro caso, se divulga un procedimiento de expansión y/o activación de células (por ejemplo, células efectoras inmunitarias). El procedimiento incluye:

proporcionar una célula que exprese CAR (por ejemplo, una primera célula que exprese CAR o una célula que exprese CAR de forma transitoria);

poner en contacto dicha célula que expresa CAR con un ligando CAR, por ejemplo, un ligando CAR como el descrito en el presente documento), en condiciones en las que se produce la expansión y/o proliferación de las células inmunitarias, produciendo así la población celular activada y/o expandida.

Como se describe en el presente documento, el ligando CAR está presente en (por ejemplo, está inmovilizado o unido a un sustrato, por ejemplo, un sustrato no natural). Como se describe en el presente documento, el sustrato es un sustrato no celular. El sustrato no celular puede ser un soporte sólido elegido entre, por ejemplo, una placa (por ejemplo, una placa de microtitulación), una membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa), una matriz, un chip o una perla. En las realizaciones, el ligando CAR está presente en el sustrato (por ejemplo, en la superficie del sustrato). El ligando CAR puede estar inmovilizado, unido o asociado de forma covalente o no covalente (por ejemplo, reticulado) al sustrato. Como se describe en el presente documento, el ligando CAR está unido (por ejemplo, unido covalentemente) a una perla. En lo anterior, la población de células inmunes puede expandirse *in vitro* o *ex vivo*. El procedimiento puede incluir además el cultivo de la población de células inmunitarias en presencia del ligando de la molécula CAR, por ejemplo, utilizando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, el procedimiento de expansión y/o activación de las células comprende además la adición de una segunda molécula estimuladora, por ejemplo, CD28. Por ejemplo, el ligando CAR y la segunda molécula estimuladora pueden ser inmovilizados a un sustrato, por ejemplo, una o más perlas, proporcionando así una mayor expansión y/o activación celular.

Como se describe en el presente documento, se proporciona un procedimiento para seleccionar o enriquecer una célula que exprese CAR. El procedimiento incluye poner en contacto la célula que expresa el CAR con un ligando CAR como se describe en el presente documento; y seleccionar la célula sobre la base de la unión del ligando CAR.

Como se describe en el presente documento, se proporciona un procedimiento para agotar, reducir y/o matar una célula que expresa CAR. El procedimiento incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando CAR como se describe en el presente documento; y la focalización de la célula sobre la base de la unión del ligando CAR, reduciendo así el número, y/o matando, de la célula que expresa CAR. En una realización, el ligando CAR está acoplado a un agente tóxico (por ejemplo, una toxina o un fármaco ablativo de células). En otra realización, el anticuerpo antiidiotípico puede causar actividad de células efectoras, por ejemplo, actividades ADCC o ADC.

Los anticuerpos anti-CAR ejemplares que pueden utilizarse en los procedimientos divulgados en el presente documento se describen, por ejemplo, en WO 2014/190273 y en Jena y otros, "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Anticuerpo to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS March 2013 8:3 e57838. Como se describe en el presente documento, la molécula de anticuerpo antiidiotipo reconoce una molécula de anticuerpo anti-CD19, por ejemplo, un scFv anti-CD19. Por ejemplo, la molécula de anticuerpos antiidiotípicos puede competir por la unión con el clon CAR mAb específico de CD19 no. 136.20.1 descrito en Jena et al., PLOS marzo 2013 8:3 e57838; puede tener las mismas CDRs (por ejemplo, una o más de, por ejemplo, todas, VH CDR1, VH CDR2, CH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3, usando la definición de Kabat, la definición de Chothia, o una combinación de las definiciones de Kabat y Chothia) como el clon CAR mAb específico de CD19 no. 136.20.1; puede tener una o más (por ejemplo, 2) regiones variables como el clon CAR mAb específico de CD19 no. 136.20.1, o puede comprender el clon CAR mAb específico de CD19 no. 136.20.1. Tal y como se describe en este documento, el anticuerpo antiidiotípico se fabricó según el procedimiento descrito en Jena et al. Tal como se describe en el presente documento, la molécula de anticuerpo antiidiotipo es una molécula de anticuerpo antiidiotipo descrita en WO 2014/190273. Como

se describe en el presente documento, la molécula de anticuerpo antiidiotipo tiene las mismas CDR (por ejemplo, una o más de, por ejemplo, todas, VH CDR1, VH CDR2, CH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3) que una molécula de anticuerpo de WO 2014/190273 como la 136.20.1; puede tener una o más (por ejemplo, 2) regiones variables de una molécula de anticuerpo de WO 2014/190273o puede comprender una molécula de anticuerpo de WO 2014/190273 como la 136.20.1. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CAR se une a una región constante del dominio de unión extracelular de la molécula CAR, por ejemplo, como se describe en WO 2014/190273. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CAR se une a una región constante del dominio de unión extracelular de la molécula CAR, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada (por ejemplo, una región bisagra CH2-CH3) o una región constante de la cadena ligera. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CAR compite por la unión con el anticuerpo monoclonal 2D3 descrito en WO 2014/190273, tiene las mismas CDR (por ejemplo, una o más de, por ejemplo, todas, VH CDR1, VH CDR2, CH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3) que 2D3, o tiene una o más (por ejemplo, 2) regiones variables de 2D3, o comprende 2D3 como se describe en WO 2014/190273.

Como se describe en el presente documento, las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento están optimizados para un subconjunto específico de células T. Como se describe en el presente documento, los subconjuntos optimizados de células T muestran una mayor persistencia en comparación con una célula T de control, por ejemplo, una célula T de un tipo diferente (por ejemplo, CD8+ o CD4+) que expresa el mismo constructo.

Como se describe en el presente documento, una célula T CD4+ comprende un CAR descrito en el presente documento, cuyo CAR comprende un dominio de señalización intracelular adecuado para (por ejemplo, optimizado para, por ejemplo, conducir a una persistencia mejorada en) una célula T CD4+, por ejemplo, un dominio ICOS. Como se describe en el presente documento, una célula T CD8+ comprende un CAR descrito en el presente documento, que comprende un dominio de señalización intracelular adecuado para (por ejemplo, optimizado para, por ejemplo, conducir a una persistencia mejorada de) una célula T CD8+, por ejemplo, un dominio 4-1BB, un dominio CD28, u otro dominio coestimulador distinto de un dominio ICOS. Como se describe en el presente documento, el CAR descrito en el presente documento comprende un dominio de unión a antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno tumoral descrito en el presente documento.

En el presente documento se describe un procedimiento para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto con cáncer. El procedimiento incluye administrar a dicho sujeto, una cantidad efectiva de:

1) una célula T CD4+ que comprende un CAR (el CARCD4+) que comprende:

un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno tumoral descrito en el presente documento;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un primer dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio ICOS; y

2) una célula T CD8+ que comprende un CAR (el CARCD8+) que comprende:

un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno tumoral descrito en el presente documento;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un segundo dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio 4-1BB, un dominio CD28 u otro dominio coestimulador que no sea un dominio ICOS;

donde el CARCD4+ y el CARCD8+ difieren entre sí.

Opcionalmente, el procedimiento incluye además la administración de:

3) una segunda célula T CD8+ que comprende un CAR (el segundo CARCD8+) que comprende:

un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno tumoral descrito en el presente documento;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, en el que el segundo CARCD8+ comprende un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización coestimulador, que no está presente en el CARCD8+ y, opcionalmente, no comprende un dominio de señalización ICOS.

ENSAYOS PARA LA ACTIVIDAD DE CAR

5 Una vez que se construye un CAR, por ejemplo, un NKR-CAR, descrito en el presente documento, se pueden utilizar varios ensayos para evaluar la actividad de la molécula, como por ejemplo, pero sin limitarse a ello, la capacidad de expandir las células T tras la estimulación del antígeno, mantener la expansión de las células T en ausencia de reestimulación, y las actividades anticancerígenas en modelos *in vitro* y animales apropiados. Los ensayos para evaluar los efectos de un NKR-CAR se describen con más detalle a continuación.

10 El análisis de transferencia Western de la expresión de NKR-CAR en células T primarias puede utilizarse para detectar la presencia de monómeros y dímeros. Véase, por *ejemplo* Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Muy brevemente, las células T (mezcla 1:1 de células T CD4+ y CD8+) que expresan los CARs se expanden *in vitro* durante más de 10 días, seguido de lisis y SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los CAR se detectan mediante transferencia western utilizando un anticuerpo específico para los componentes del CAR, por ejemplo, un componente
15 NKR, por ejemplo, un componente KIR. Los mismos subconjuntos de células T se utilizan para el análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras para permitir la evaluación de la formación de dímeros covalentes.

La expansión *in vitro* de las células T CAR+ tras la estimulación del antígeno puede medirse por citometría de flujo. Por ejemplo, se estimula una mezcla de células T CD4+ y CD8+ con aAPCs α CD3/ α CD28 seguida de la transducción con vectores lentivirales que expresan GFP bajo el control de los promotores que se van a analizar. Los promotores
20 ejemplares incluyen el gen IE del CMV, el EF-1 α , la ubiquitina C o los promotores de la fosfogliceroquinasa (PGK). La fluorescencia de la GFP se evalúa el día 6 de cultivo en los subconjuntos de células T CD4+ y/o CD8+ mediante citometría de flujo. Véase, por *ejemplo* Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Alternativamente, se estimula una mezcla de células T CD4+ y CD8+ con perlas magnéticas recubiertas de α CD3/ α CD28 el día 0, y se transduce con CAR el día 1 utilizando un vector lentiviral bicistrónico que expresa CAR junto con eGFP utilizando una
25 secuencia de omisión ribosomal 2A. Los cultivos se reestiman con células K562 que expresan el antígeno tumoral, con células K562 de tipo salvaje (K562 tipo salvaje) o con células de control negativo que no expresan el antígeno tumoral. La IL-2 exógena se añade a los cultivos cada dos días a 100 UI/ml. Las células T GFP+ se enumeran mediante citometría de flujo utilizando un recuento basado en microesferas. Véase, por *ejemplo* Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009).

30 También se puede medir la expansión sostenida de células T CAR+ en ausencia de reestimulación. Véase, por *ejemplo* Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). En resumen, el volumen medio de células T (fl) se mide en el día 8 de cultivo utilizando un contador de partículas Coulter Multisizer III, un Nexcelom Cellometer Vision o un Millipore Scepter, tras la estimulación con perlas magnéticas recubiertas de α CD3/ α CD28 en el día 0, y la transducción con el CAR indicado en el día 1.

35 También se pueden utilizar modelos animales para medir la actividad de una célula que exprese CAR. Por ejemplo, se puede utilizar un modelo de xenoinjerto con células T KIR-CAR+ específicas de mesotelina humana para tratar un cáncer humano primario que exprese mesotelina, por ejemplo, mesotelioma o cáncer de ovario, en ratones inmunodeficientes. Véase, por *ejemplo* Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Muy brevemente, tras el establecimiento del tumor, los ratones son aleatorizados en cuanto a los grupos de tratamiento. Se administran
40 diferentes números de células T que expresan CAR. La expresión de CAR y la proliferación/persistencia de las células que expresan CAR pueden ser monitoreadas en varios puntos de tiempo. Se evalúa la progresión del tumor en los animales a intervalos semanales. Las curvas de supervivencia de los grupos se comparan mediante la prueba de intervalos logarítmicos. Se puede evaluar la respuesta al tratamiento con CAR dependiente de la dosis. Véase, por *ejemplo* Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009).

45 La evaluación de la proliferación celular y la producción de citoquinas de las células que expresan CAR se ha descrito previamente, por *ejemplo*, en Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). En resumen, la evaluación de la proliferación mediada por CAR se realiza en placas de microtitulación mezclando células T lavadas con células K562 que expresan CD19 (K19) o CD32 y CD137 (KT32-BBL) para una relación final de células T:K562 de 2:1. Las células K562 se irradian con radiación gamma antes de su uso. Los anticuerpos monoclonales anti-CD3 (clon OKT3)
50 y anti CD28 (clon 9.3) se añaden a los cultivos con células KT32-BBL para que sirvan de control positivo para estimular la proliferación de células T, ya que estas señales favorecen la expansión de células T CD8+ a largo plazo *ex vivo*. Las células T se enumeran en los cultivos utilizando las perlas fluorescentes CountBright™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y la citometría de flujo como describe el fabricante. Las células T CAR+ se identifican mediante la expresión de GFP utilizando células T diseñadas con vectores lentivirales que expresan CAR enlazados a eGFP-2A. En el caso de las
55 células T CAR+ que no expresan GFP, las células T CAR+ se detectan con la proteína antígeno tumoral recombinante biotinilada y un conjugado secundario avidina-PE. La expresión de CD4+ y CD8+ en las células T también se detecta simultáneamente con anticuerpos monoclonales específicos (BD Biosciences). Las mediciones de citoquinas se realizan en sobrenadantes recogidos 24 horas después de la reestimulación utilizando el kit de matriz citométrica de citoquinas TH1/TH2 humanas (BD Biosciences, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante o utilizando un

kit Luminex 30-plex (Invitrogen). La fluorescencia se evalúa con un citómetro de flujo BD Fortessa, y los datos se analizan según las instrucciones del fabricante. Se pueden realizar experimentos similares con CD123 CARTS.

La citotoxicidad puede evaluarse mediante un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr . Véase, por ejemplo Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). En resumen, las células diana (líneas K562 que expresan el antígeno tumoral y células tumorales primarias) se cargan con ^{51}Cr (como NaCrO_4 , New England Nuclear, Boston, MA) a 37°C durante 2 horas con agitación frecuente, se lavan dos veces en RPMI completo y se colocan en placas de microtitulación. Las células T efectoras se mezclan con las células diana en los pocillos en RPMI completo en relaciones variables de células efectoras:células diana (E:T). También se preparan pocillos adicionales que contienen sólo medio (liberación espontánea, SR) o una solución al 1 % de detergente Triton-X 100 (liberación total, TR). Tras 4 horas de incubación a 37°C , se recoge el sobrenadante de cada pocillo. El ^{51}Cr liberado se mide entonces con un contador de partículas gamma (Packard Instrument Co., Waltham, MA). Cada condición se realiza al menos por triplicado, y el porcentaje de lisis se calcula mediante la fórmula: $\% \text{Lisis} = (\text{ER} - \text{SR}) / (\text{TR} - \text{SR})$, donde ER representa el promedio de ^{51}Cr liberado para cada condición experimental.

Las tecnologías de imagen pueden utilizarse para evaluar el tráfico específico y la proliferación de CARs en modelos animales portadores de tumores. Estos ensayos se han descrito, por ejemplo, en Barrett et al., *Human Gene Therapy* 22:1575-1586 (2011). En resumen, los ratones NOD/SCID/ $\gamma\text{c}^-/-$ (NSG) son inyectados por vía intravenosa con células Nalm-6 y, 7 días después, con células T 4 horas después de la electroporación con los constructos CAR. Las células T se transfectan de forma estable con un constructo lentiviral para expresar luciferasa de luciérnaga, y se toman imágenes de los ratones para ver la bioluminiscencia. Alternativamente, la eficacia terapéutica y la especificidad de una única inyección de células T CAR+ en el modelo de xenoinjerto Nalm-6 puede medirse de la siguiente manera: Los ratones NSG son inyectados con Nalm-6 transducido para expresar de forma estable la luciferasa de luciérnaga, seguido de una única inyección en la vena de la cola de células T electroporadas con CAR 7 días después. Los animales son fotografiados en varios momentos después de la inyección. Por ejemplo, se pueden generar mapas de calor de densidad de fotones de la leucemia positiva a la luciferasa de luciérnaga en ratones representativos en el día 5 (2 días antes del tratamiento) y en el día 8 (24 horas después de CAR+ PBL).

Otros ensayos, incluidos los descritos en la sección de ejemplos del presente documento, así como los conocidos en la técnica, también pueden utilizarse para evaluar los constructos de CAR de la divulgación.

APLICACIÓN TERAPÉUTICA

La presente divulgación abarca una célula (por ejemplo, célula T o célula NK) modificada para expresar un NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR, o una pluralidad de tipos de NKR-CAR, por ejemplo, KIR-CAR, en los que cada NKR-CAR, por ejemplo, KIR-CAR, combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un componente de un NKR, por ejemplo, un KIR

Como se describe en el presente documento, los KIR-CARs de la divulgación comprenden un KIR activador que suministra su señal a través de una interacción con la proteína de membrana que contiene el motivo de activación basado en la inmutribosina (ITAM), DAP12 que está mediada por residuos dentro de los dominios transmembrana de estas proteínas.

Como se describe en el presente documento, los KIR-CAR de la divulgación comprenden un KIR inhibidor que suministra su señal a través de uno o más motivos inhibidores basados en inmutirosina (ITIM) que interactúan directa o indirectamente con proteínas de señalización citoplasmática como las proteínas SHP-1, SHP-2 y la familia Vav. Los KIRs con dominios citoplasmáticos que contienen (ITIMs) anulan la señal de activación que conduce a la inhibición de la actividad citolítica y productora de citoquinas de las NK. En algunos casos, la célula T modificada que expresa un KIR-CAR de la divulgación puede provocar una respuesta de células T mediada por KIR-CAR. Como se describe en el presente documento, la dependencia de la unión a más de un tipo de antígeno permite a la célula T modificada exhibir una mayor especificidad para provocar una respuesta al unirse a una célula tumoral en lugar de una célula secundaria normal.

La divulgación proporciona el uso de una pluralidad de tipos de KIR- CARs para redirigir la especificidad de una célula T primaria hacia un antígeno tumoral. Así, la presente divulgación también proporciona un procedimiento para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T a una población celular o tejido diana en un mamífero que comprende el paso de administrar al mamífero una célula T que expresa una pluralidad de tipos de KIR-CAR, en el que cada tipo de KIR-CAR comprende una fracción de unión que interactúa específicamente con una diana predeterminada. En una realización, la célula comprende un primer KIR-CAR que comprende un KIR activador (actKIR-CAR), y un segundo KIR-CAR que comprende un KIR inhibidor (inhKIR-CAR).

Sin querer estar limitado por ninguna teoría en particular, la respuesta de inmunidad antitumoral provocada por las células T modificadas con KIR-CAR puede ser una respuesta inmune activa o pasiva. Además, la respuesta inmunitaria mediada por KIR-CAR puede formar parte de un enfoque de inmunoterapia adoptiva en el que las células T modificadas por KIR-CAR inducen una respuesta inmunitaria específica al dominio de unión al antígeno en el KIR-CAR

Los cánceres que pueden ser tratados incluyen tumores que no están vascularizados, o que aún no están sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos (como tumores hematológicos, por ejemplo, leucemias y linfomas) o pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cáncer a tratar con los CAR de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemias o tumores linfoides malignos, tumores benignos y malignos, por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas. También se incluyen los tumores/cánceres de adultos y los tumores/cánceres pediátricos. En una realización, el cáncer a tratar en un tumor sólido, por ejemplo, un tumor sólido descrito en el presente documento.

Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o de la médula ósea. Entre los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) se encuentran las leucemias, incluidas las leucemias agudas (como la leucemia linfocítica aguda, la leucemia mielocítica aguda, la leucemia mielógena aguda y las leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas y eritroleucémicas), las leucemias crónicas (como la leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que normalmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los distintos tipos de tumores sólidos reciben el nombre del tipo de células que los forman (como sarcomas, carcinomas y linfomas). Ejemplos de tumores sólidos, como sarcomas y carcinomas, son el fibrosarcoma, el mixosarcoma, el liposarcoma, el condrosarcoma, el osteosarcoma y otros sarcomas, el sinovioma, el mesotelioma, el tumor de Ewing, el leiomiomasarcoma, el rabdomiosarcoma, el carcinoma de colon, la neoplasia linfóide, el cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (como un glioma (como un glioma del tronco cerebral y gliomas mixtos), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme) astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, craneofaringioma de Schwann, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebrales).

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células inmunitarias efectoras (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar CD19 CAR, por ejemplo, con un dominio de unión anti CD19 descrito en el presente documento, en el que las células cancerosas expresan CD19. En una realización, el cáncer a tratar es LLA (leucemia linfoblástica aguda), LLC (leucemia linfocítica crónica), LDCB (linfoma difuso de células B grandes), LCM (linfoma de células del manto) o MM (mieloma múltiple).

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células inmunitarias efectoras (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar un EGFRvIIICAR, por ejemplo, con un dominio de unión anti-EGFRvIII descrito en el presente documento, en el que las células cancerosas expresan EGFRvIII. Tal y como se describe en este documento, el cáncer a tratar es el glioblastoma.

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar un CAR de mesotelina, por ejemplo, con un dominio de unión a la anti-mesotelina descrito en el presente documento, en el que las células cancerosas expresan mesotelina. Como se describe en el presente documento, el cáncer a tratar es un tumor sólido, por ejemplo, un tumor sólido descrito en el presente documento, por ejemplo, mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón o cáncer de ovario.

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar un CD123CAR, por ejemplo, con un dominio de unión anti CD123 descrito en el presente documento, en el que las células cancerosas expresan CD123. En una realización, el cáncer a tratar es la LMA

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar un CLL-1CAR, por ejemplo, con un dominio de unión anti-CLL-1 descrito en el presente documento, en el que las células cancerosas expresan CLL-1. Como se describe en este documento, el cáncer a tratar es la LMA

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar un CD33CAR, por ejemplo, con un dominio de unión anti-CD33 descrito en el presente

documento, en el que las células cancerosas expresan CD33. Como se describe en este documento, el cáncer a tratar es la LMA

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar un GD2CAR, por ejemplo, con un dominio de unión anti-GD2 descrito en el presente documento, en el que las células cancerosas expresan GD2. Tal y como se describe en el presente documento, el cáncer a tratar es el neuroblastoma.

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar un o-acetil-GD2CAR, en el que las células cancerosas expresan o-acetil-GD2. Tal y como se describe en este documento, el cáncer a tratar es un neuroblastoma o un melanoma.

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar un BCMACAR, por ejemplo, con un dominio de unión anti-BCMA descrito en el presente documento, en el que las células cancerosas expresan BCMA. Tal y como se describe en el presente documento, el cáncer a tratar es el mieloma múltiple.

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar un CLDN6CAR, por ejemplo, con un dominio de unión anti-CLDN6 descrito en el presente documento, en el que las células cancerosas expresan CLDN6. Como se describe en el presente documento, el cáncer a tratar es un tumor sólido, por ejemplo, un tumor sólido descrito en el presente documento, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de pulmón o cáncer de mama.

Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para expresar un WT1CAR, por ejemplo, con un dominio de unión anti-WT1 descrito en el presente documento, en el que las células cancerosas expresan WT1.

Como se describe en el presente documento, el dominio de unión a antígeno de las células KIR-CAR, por ejemplo, células T o células NK, de la divulgación está diseñado para tratar un cáncer particular. Como se describe en el presente documento, las células KIR-CAR, por ejemplo, células T o células NK, de la divulgación se modifican para expresar un primer actKIR-CAR direccionado a un primer antígeno y un segundo inhKIR-CAR direccionado a un segundo antígeno, donde el primer antígeno se expresa en un tumor o cáncer particular y el segundo antígeno no se expresa en un tumor o cáncer particular. De esta manera, la activación condicional de las células T se genera por el acoplamiento de actKIR-CAR (o TCR-zeta CAR estándar que lleva un scFv a un antígeno en la célula maligna de interés) y el inhKIR-CAR que lleva, por ejemplo, un scFv dirigido contra un antígeno que está presente en el tejido normal, pero no en el maligno, proporciona la inhibición de la señal de activación del actKIR-CAR cuando la célula T KIR-CAR encuentra células normales. Entre los ejemplos de antígenos que sirven de dianas útiles para los CAR inhibidores se encuentran los receptores de efrina (Pasquale, 2010, Nat Rev Cancer 10(3):165-80) y las claudinas (Singh et al., 2010, J Oncol, 2010:541957), que son expresados por las células epiteliales de los tejidos normales, pero que a menudo se pierden selectivamente en los cánceres (por ejemplo, EPHA7).

Aplicaciones terapéuticas de las enfermedades y trastornos que expresan mesotelina

La presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para tratar enfermedades y trastornos asociados con la expresión de mesotelina. Ejemplos de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de mesotelina incluyen el mesotelioma (por ejemplo, mesotelioma pleural, mesotelioma peritoneal, mesotelioma pericárdico), el cáncer de páncreas o el cáncer de ovario. La enfermedad o trastorno asociado a la expresión de mesotelina es un tumor sólido descrito en el presente documento.

El mesotelioma maligno es un tipo de cáncer que se produce en la fina capa de células que recubre los órganos internos del cuerpo, conocida como mesotelio. Existen tres tipos reconocidos de mesotelioma. El mesotelioma pleural (por ejemplo, el mesotelioma pleural maligno o MPM) es la forma más común de la enfermedad, representando aproximadamente el 70 % de los casos, y se produce en el revestimiento del pulmón conocido como pleura. El mesotelioma peritoneal se produce en el revestimiento de la cavidad abdominal, conocido como peritoneo. El mesotelioma pericárdico se origina en el pericardio, que recubre el corazón.

Un sujeto puede estar en riesgo de desarrollar un mesotelioma si ha estado expuesto al amianto. La exposición al amianto y la inhalación de partículas de amianto pueden causar mesotelioma. En la mayoría de los casos, los síntomas del mesotelioma no aparecen en un sujeto expuesto al amianto hasta muchos años después de la exposición.

Los síntomas del mesotelioma pleural incluyen, por ejemplo, dolor lumbar o dolor torácico lateral, y dificultad para respirar. Otros síntomas son la dificultad para tragar, la tos persistente, la fiebre, la pérdida de peso o la fatiga. Otros síntomas que experimentan algunos pacientes son debilidad muscular, pérdida de capacidad sensorial, tos con

sangre, hinchazón de la cara y los brazos y ronquera. En las primeras fases de la enfermedad, como el mesotelioma en fase 1, los síntomas pueden ser leves. Los pacientes suelen referir dolor en una zona del pecho que parece no desaparecer nunca, pérdida de peso y fiebre.

5 El mesotelioma peritoneal se origina en el abdomen y, como resultado, los síntomas suelen incluir dolor abdominal, pérdida de peso, náuseas y vómitos. También puede producirse una acumulación de líquido en el abdomen como consecuencia del cáncer. El mesotelioma peritoneal se origina en el abdomen y suele extenderse a otros órganos de la zona, como el hígado, el bazo o el intestino. El dolor abdominal severo es la queja más común que los pacientes experimentan por primera vez. También puede haber un nivel de incomodidad con la acumulación de líquido en el abdomen. Otros síntomas del mesotelioma peritoneal pueden ser dificultad para defecar, náuseas y vómitos, fiebre y
10 pies hinchados.

El mesotelioma pericárdico es la forma menos común de mesotelioma. El mesotelioma pericárdico, como su nombre indica, afecta al corazón. Este raro tipo de mesotelioma invade el pericardio, el saco que rodea el corazón. A medida que el cáncer avanza, el corazón no es capaz de suministrar oxígeno de forma tan eficiente al cuerpo, lo que provoca un mayor deterioro de la salud a un ritmo cada vez más rápido. Los síntomas más comunes asociados al mesotelioma pericárdico se asemejan a los de un ataque al corazón: náuseas, dolor en el pecho y dificultad para respirar.
15

Los sujetos que se benefician del tratamiento según la divulgación incluyen sujetos con un mesotelioma, o sujetos que se sospecha que tienen mesotelioma, por ejemplo, como se evidencia por la presencia de uno o más de los síntomas descritos en el presente documento y/o la exposición al amianto. Como se describe en el presente documento, el mesotelioma es un mesotelioma pleural (por ejemplo, un mesotelioma pleural maligno). En otros aspectos, se puede tratar al sujeto que tiene una condición precancerosa como, por ejemplo, placas pleurales, mesotelioma benigno o hiperplasia mesotelial.
20

Otro ejemplo de enfermedad o trastorno asociado a la mesotelina es el cáncer de páncreas. Los cánceres de páncreas que pueden tratarse con los procedimientos descritos en el presente documento incluyen, entre otros, los cánceres de páncreas exocrino y endocrino. Los cánceres pancreáticos exocrinos incluyen, entre otros, adenocarcinomas, carcinomas de células acinares, carcinomas adenoescamosos, carcinomas coloides, carcinomas indiferenciados con células gigantes similares a las de los osteoclastos, carcinomas hepatoides neoplasias papilomucinosas intraductales, neoplasias quísticas mucinosas, pancreatoblastomas, cistadenomas serosos, carcinomas de células en anillo de sello, tumores sólidos y pseudopapilares, carcinomas ductales pancreáticos y carcinomas indiferenciados. Como se describe en el presente documento, el cáncer de páncreas exocrino es un carcinoma ductal pancreático. Los cánceres endocrinos de páncreas incluyen, entre otros, los insulinomas y los glucagonomas.
25
30

Como se describe en el presente documento, el cáncer de páncreas es cualquiera de los cánceres de páncreas en fase inicial, cáncer de páncreas no metastásico, cáncer de páncreas primario, cáncer de páncreas reseado, cáncer de páncreas avanzado, cáncer de páncreas localmente avanzado, cáncer de páncreas metastásico, cáncer de páncreas no reseable, cáncer de páncreas en remisión, cáncer de páncreas recurrente, cáncer de páncreas en un entorno adyuvante o cáncer de páncreas en un entorno neoadyuvante. Como se describe en el presente documento, el cáncer de páncreas es un cáncer de páncreas localmente avanzado, un cáncer de páncreas irreseable o un carcinoma ductal pancreático metastásico. Como se describe en el presente documento, el cáncer de páncreas es resistente a la terapia basada en gemcitabina. Como se describe en el presente documento, el cáncer de páncreas es refractario a la terapia basada en gemcitabina.
35

Como se describe en el presente documento, el trastorno asociado a la expresión de mesotelina es el cáncer de ovario. El cáncer de ovario se clasifica según la histología del tumor. El tumor epitelialstromal de superficie, también conocido como carcinoma epitelial de ovario, es el tipo más común de cáncer de ovario. Incluye el tumor seroso (incluido el cistadenocarcinoma papilar seroso), el tumor endometriode y el cistadenocarcinoma mucinoso.
40

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden utilizarse para tratar varios estadios del cáncer de ovario, por ejemplo, el estadio I, el estadio II, el estadio III o el estadio IV. La estadificación puede realizarse, por ejemplo, cuando se extirpa el cáncer de ovario. El cáncer de ovario se clasifica de la siguiente manera:
45

El cáncer en estadio I se limita a uno o ambos ovarios. El cáncer está en estadio II si uno o ambos ovarios están afectados y se han extendido al útero y/o a las trompas de Falopio o a otros lugares de la pelvis. El cáncer se encuentra en el estadio III si uno o ambos ovarios están afectados y se han extendido a los ganglios linfáticos o a otros lugares fuera de la pelvis, pero todavía están dentro de la cavidad abdominal, como la superficie del intestino o el hígado. El cáncer está en estadio IV si uno o ambos ovarios están afectados y el cáncer se ha extendido fuera del abdomen o al interior del hígado.
50

Como se describe en el presente documento, el cáncer de ovario es resistente a uno o más agentes quimioterapéuticos. Como se describe en el presente documento, el cáncer de ovario es refractario a uno o más agentes quimioterapéuticos.
55

Otros tipos de cáncer que pueden tratarse con las composiciones de CAR descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, el cáncer cerebral, el cáncer de vejiga, el cáncer de mama, el cáncer de cuello uterino, el cáncer colorrectal, el cáncer de hígado, el cáncer de riñón, el linfoma, la leucemia, el cáncer de pulmón (por ejemplo,

adenocarcinoma de pulmón), melanoma, melanoma metastásico, mesotelioma, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de piel, timoma, sarcoma, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, cáncer de útero y cualquier combinación de los mismos.

5 La presente divulgación proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir una población de células que expresan mesotelina, los procedimientos comprenden el contacto de una población de células que comprenden una célula que expresa mesotelina con una célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina. En una realización específica, la divulgación proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan mesotelina, los procedimientos comprenden el contacto de la población de células cancerosas que expresan mesotelina con una célula que expresa mesotelina
 10 CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina. En otra realización, la divulgación proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan mesotelina, los procedimientos comprenden el contacto de la población de células cancerosas que expresan mesotelina con una célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina. En ciertas realizaciones, la célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación reduce la cantidad, el número, la cantidad o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 65 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % en un sujeto con o modelo animal de mesotelioma u otro cáncer asociado con células que expresan mesotelina en relación con un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un humano.

20 La divulgación también proporciona procedimientos para prevenir, tratar y/o manejar un trastorno asociado con células que expresan mesotelina (por ejemplo, mesotelioma), los procedimientos comprenden administrar a un sujeto necesitado una célula que expresa CAR de mesotelioma de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina. Como se describe en este documento, el sujeto es un humano.

25 La divulgación proporciona procedimientos para prevenir la recaída del cáncer asociado con células que expresan mesotelina, los procedimientos comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina. Como se describe en el presente documento, los procedimientos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina en combinación con una cantidad efectiva de otra terapia.

30 En un aspecto, la divulgación se refiere a un vector que comprende una secuencia que codifica un CAR de mesotelina unido operativamente a un promotor para su expresión en células efectoras inmunitarias de mamíferos. En un aspecto, la divulgación proporciona una célula efectora inmune recombinante que expresa el CAR de mesotelina para su uso en el tratamiento de tumores que expresan mesotelina. En un aspecto, la célula que expresa la mesotelina CAR de la divulgación es capaz de ponerse en contacto con una célula tumoral con al menos un CAR de mesotelina de la divulgación expresado en su superficie, de manera que la célula que expresa la mesotelina CAR se activa en respuesta al antígeno y la célula que expresa el CAR se dirige a la célula cancerosa y se inhibe el crecimiento del cáncer.
 35

40 En un aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa que expresa mesotelina, que comprende el contacto de la célula tumoral con la célula que expresa α -mesotelina CAR, de manera que la célula que expresa CAR se activa en respuesta al antígeno y se dirige a la célula cancerosa, en la que se inhibe el crecimiento del cáncer. Como se describe en este documento, el CART activado se dirige a la célula cancerosa y la mata.

45 Como se describe en el presente documento, la divulgación se refiere a un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto. El procedimiento comprende la administración al sujeto de una célula que expresa mesotelina CAR, de manera que se trata el cáncer en el sujeto. Un ejemplo de un cáncer que es tratable por la célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación es un cáncer asociado con la expresión de mesotelina. Como se describe en el presente documento, el cáncer asociado a la expresión de mesotelina se selecciona entre el mesotelioma, el cáncer de páncreas, el cáncer de ovario y el cáncer de pulmón.

50 La divulgación incluye un tipo de terapia celular en la que las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, las células T o las células NK, se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula que expresa el CAR se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de eliminar las células tumorales del receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células inmunitarias efectoras modificadas con CAR son capaces de replicarse *in vivo*, lo que da lugar a una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control sostenido del tumor. En varios aspectos, las células administradas al paciente, o su progenie, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años o cinco años después de la administración de la célula al paciente.
 55

La divulgación también incluye un tipo de terapia celular en la que las células efectoras inmunitarias se modifican, por ejemplo, mediante ARN transcrito *in vitro*, para expresar transitoriamente un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula que expresa el CAR se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de eliminar las

células cancerosas del receptor. Así, las células administradas al paciente, están presentes durante menos de un mes, por ejemplo, tres semanas, dos semanas, una semana, después de la administración de la célula al paciente.

5 Sin querer estar limitado por ninguna teoría en particular, la respuesta inmunitaria anticancerosa provocada por las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva, o
 10 alternatively puede deberse a una respuesta inmunitaria directa o indirecta. Como se describe en el presente documento, las células T transducidas con CAR muestran una secreción específica de citoquinas proinflamatorias y una potente actividad citolítica en respuesta a las células cancerosas humanas que expresan mesotelina, y median en la muerte de los transeúntes y en la regresión de un tumor humano establecido. Por ejemplo, las células tumorales sin antígeno dentro de un campo heterogéneo de tumor con expresión de mesotelina pueden ser susceptibles de ser
 15 destruidas indirectamente por las células T redirigidas por la mesotelina que ha reaccionado previamente contra las células cancerosas adyacentes con antígeno positivo.

Como se describe en el presente documento, las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR totalmente humanas de la divulgación pueden ser un tipo de vacuna para la inmunización *ex vivo* y/o la terapia *in vivo* en un mamífero. Como se describe en este documento, el mamífero es un humano.

15 Con respecto a la inmunización *ex vivo*, al menos una de las siguientes acciones tiene lugar *in vitro* antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un KIR-CAR en las células, y/o iii) criopreservación de las células.

20 Los procedimientos *ex vivo* son bien conocidos en la técnica y se discuten más ampliamente a continuación. En resumen, las células se aíslan de un mamífero (preferiblemente un humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan *in vitro*) con un vector que expresa un KIR-CAR divulgado en el presente documento. La célula modificada con KIR-CAR puede administrarse a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un humano y la célula modificada con KIR-CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Alternativamente, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

25 El procedimiento para la expansión *ex vivo* de células madre y progenitoras hematopoyéticas se describe en U.S. Pat. Nº 5.199.942 puede aplicarse a las células de la presente divulgación. Se conocen otros procedimientos adecuados en la técnica, por lo que la presente divulgación no se limita a ningún procedimiento particular de expansión *ex vivo* de las células. En resumen, el cultivo y la expansión *ex vivo* de células T comprende: (1) recoger células madre y
 30 progenitoras hematopoyéticas CD34+ de un mamífero a partir de una recolección de sangre periférica o de explantes de médula ósea; y (2) expandir dichas células *ex vivo*. Además de los factores de crecimiento celular descritos en Pat. de los EE.UU. Nº 5.199.942, en el caso de las células de la familia de la diabetes, se pueden utilizar otros factores, como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, para el cultivo y la expansión de las células.

35 Además de utilizar una vacuna basada en células en términos de inmunización *ex vivo*, la presente divulgación también proporciona composiciones y procedimientos para la inmunización *in vivo* para provocar una respuesta inmune dirigida contra un antígeno en un paciente.

40 En general, las células activadas y expandidas como se describe en el presente documento pueden utilizarse en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surgen en individuos que están inmunocomprometidos. En particular, las células T modificadas con KIR-CAR de la divulgación se utilizan en el tratamiento del cáncer. Como se describe en el presente documento, las células de la divulgación se utilizan en el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar cáncer. Así, la presente divulgación proporciona procedimientos para el tratamiento o la prevención del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T modificadas con KIR-CAR de la divulgación.

45 Las células T modificadas con KIR-CAR de la presente divulgación pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender una población celular diana como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluir tampones, como la solución salina neutra, la solución salina fosfatada y similares; hidratos de carbono, como la glucosa, la manosa, la sacarosa o los dextranos, el manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos, como la glicina; antioxidantes; agentes quelantes, como el EDTA o el glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las
 50 composiciones de la presente divulgación se formulan preferentemente para su administración intravenosa.

55 La presente divulgación también proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir una población de células que expresan mesotelina, los procedimientos comprenden el contacto de una población de células que comprenden una célula que expresa mesotelina con una célula que expresa mesotelina CAR (por ejemplo, un NKR-CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina). Como se describe en el presente documento, la divulgación proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan mesotelina, los procedimientos comprenden el contacto de la población de células cancerosas que expresan mesotelina con una célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina. En un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir

la población de células cancerosas que expresan mesotelina, los procedimientos comprenden el contacto de la población de células cancerosas que expresan mesotelina con una célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina. Como se describe en el presente documento, la célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación reduce la cantidad, el número, la cantidad o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 65 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % en un sujeto o modelo animal de mesotelioma u otro cáncer asociado con células que expresan mesotelina en relación con un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un humano.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para prevenir, tratar y/o manejar una enfermedad asociada con células que expresan mesotelina (por ejemplo, mesotelioma), los procedimientos comprenden administrar a un sujeto necesitado una célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina. En un aspecto, el sujeto es un humano.

La presente divulgación proporciona procedimientos para prevenir la recaída del cáncer asociado con células que expresan mesotelina, los procedimientos comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina. Como se describe en el presente documento, los procedimientos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una célula que expresa mesotelina CAR de la divulgación que se une a la célula que expresa mesotelina en combinación con una cantidad efectiva de otra terapia.

TERAPIAS COMBINADAS

Una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede utilizarse en combinación con otros agentes y terapias conocidos. Administrado "en combinación", como se utiliza en el presente documento, significa que dos (o más) tratamientos diferentes se administran al sujeto durante el curso de la afección del sujeto con el trastorno, por ejemplo, los dos o más tratamientos se administran después de que el sujeto haya sido diagnosticado con el trastorno y antes de que el trastorno haya sido curado o eliminado o el tratamiento haya cesado por otras razones. Tal y como se describe en este documento, la administración de un tratamiento todavía está ocurriendo cuando comienza la administración del segundo, de modo que hay un solapamiento en términos de administración. Esto se denomina a veces "administración simultánea" o "concurrente". Como se describe en este documento, la administración de un tratamiento termina antes de que comience la administración del otro tratamiento. Como se describe en este documento, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, por ejemplo, se observa un efecto equivalente con menos cantidad del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor medida, de lo que se observaría si el segundo tratamiento se administrara en ausencia del primer tratamiento, o la situación análoga se observa con el primer tratamiento. Como se describe en el presente documento, la administración es tal que la reducción de un síntoma u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor que la que se observaría con un tratamiento administrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo o mayor que aditivo. La administración puede ser tal que un efecto del primer tratamiento administrado es todavía detectable cuando se administra el segundo.

Una célula que expresa CAR descrita en el presente documento y el al menos un agente terapéutico adicional pueden administrarse simultáneamente, en la misma o en composiciones separadas, o secuencialmente. Para la administración secuencial, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede administrarse en primer lugar, y el agente adicional puede administrarse en segundo lugar, o el orden de administración puede invertirse.

La terapia CAR y/u otros agentes, procedimientos o modalidades terapéuticas pueden administrarse durante períodos de trastorno activo, o durante un período de remisión o enfermedad menos activa. La terapia CAR puede administrarse antes del otro tratamiento, simultáneamente con el tratamiento, después del tratamiento o durante la remisión del trastorno.

Cuando se administra en combinación, la terapia CAR y el agente adicional (por ejemplo, el segundo o tercer agente), o todos, pueden administrarse en una cantidad o dosis que es mayor, menor o igual que la cantidad o dosis de cada agente utilizado individualmente, por ejemplo, como monoterapia. Como se describe en el presente documento, la cantidad o dosis administrada de la terapia CAR, el agente adicional (por ejemplo, el segundo o tercer agente), o todos, es menor (por ejemplo, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 % o al menos el 50 %) que la cantidad o dosis de cada agente utilizado individualmente, por ejemplo, como monoterapia. Como se describe en el presente documento, la cantidad o la dosis de la terapia CAR, del agente adicional (por ejemplo, el segundo o tercer agente), o de todos ellos, que da lugar a un efecto deseado (por ejemplo, el tratamiento del cáncer) es menor (por ejemplo, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 % o al menos un 50 % menor) que la cantidad o la dosis de cada agente utilizado individualmente, por ejemplo, como monoterapia, necesaria para lograr el mismo efecto terapéutico.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede utilizarse en un régimen de tratamiento en combinación con cirugía, citoquinas, radiación o quimioterapia como citoxan, fludarabina, inhibidores de la histona desacetilasa, agentes desmetilantes o vacuna peptídica, como la descrita en Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

En ciertos casos, los compuestos de la presente divulgación se combinan con otros agentes terapéuticos, como otros agentes anticancerígenos, agentes antialérgicos, agentes contra las náuseas (o antieméticos), analgésicos, agentes citoprotectores y combinaciones de los mismos.

5 Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede utilizarse en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos ejemplares incluyen una antraciclina (por ejemplo, doxorubicina (por ejemplo, doxorubicina liposomal)), un alcaloide de vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina), un agente alquilante (por ejemplo, ciclofosfamida, decarbazina, melfalán, ifosfamida, temozolomida), un anticuerpo de células inmunitarias (por ejemplo, alemtuzamab, gemtuzumab, rituximab, ofatumumab, tositumomab, brentuximab), un antimetabolito (incluyendo, por ejemplo, antagonistas del ácido fólico, análogos de la pirimidina, análogos de la purina e inhibidores de la adenosina deaminasa (por ejemplo, fludarabina)), un inhibidor de mTOR, un agonista de la proteína relacionada con el TNFR inducido por glucocorticoides (GITR), un inhibidor del proteosoma (por ejemplo aclacinomicina A, gliotoxina o bortezomib), un inmunomodulador como la talidomida o un derivado de la talidomida (por ejemplo, lenalidomida).

15 Los agentes quimioterapéuticos generales considerados para su uso en terapias combinadas incluyen anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfán (Myleran®) busulfán inyectable (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonil-5-deoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucil (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytosan® o Neosar®), citarabina, arabinósido de citosina (Cytosar-U®), inyección liposomal de citarabina (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (Actinomycin D, Cosmegán), clorhidrato de daunorrubicina (Cerubidine®), inyección liposomal de citrato de daunorrubicina (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), clorhidrato de doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (Vepesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Acrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacicitabina, Gemcitabina (difluorodeoxicitidina), hidroxiaurea (Hydrea®), Idarubicina (Idamycin®), ifosfamida (IFEX®), irinotecán (Camptosar®), L-asparaginasa (ELSPAR®), leucovorina cálcica, melfalán (Alkeran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), 25 mitoxantrona (Novantrone®), mylotarg, paclitaxel (Taxol®), phoenix (Yttrium90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosan 20 con implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex®), teniposida (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), clorhidrato de topotecán inyectable (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y vinorelbina (Navelbine®).

30 Los agentes anticancerígenos de particular interés para las combinaciones con los compuestos de la presente divulgación incluyen antraciclinas; agentes alquilantes; antimetabolitos; fármacos que inhiben la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina o la p70S6 quinasa FK506) o que inhiben la p70S6 quinasa; inhibidores de mTOR; inmunomoduladores; antraciclinas; alcaloides de la vinca; inhibidores del proteosoma; agonistas del GITR; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; un inhibidor de la quinasa CDK4; un inhibidor de la BTK; un inhibidor de la quinasa MKN; un inhibidor de la quinasa DGK; o un virus oncolítico.

35 Los antimetabolitos ejemplares incluyen, sin limitación, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina deaminasa): metotrexato (Rheumatrex®, Trexall®), 5-fluorouracilo (Acrucil®, Efudex®, Fluoroplex®), floxuridina (FUDF®), citarabina (Cytosar-U®, Tarabine PFS), 6-mercaptopurina (Puri-Nethol®), 6-tioguanina (Thioguanine Tabloid®) fosfato de fludarabina (Fludara®), pentostatina (Nipent®), pemetrexed (Alimta®), raltitrexed (Tomudex®), cladribina (Leustatin®), clofarabina (Clofarex®, Clolar®), azacitidina (Vidaza®), decitabina y gemcitabina (Gemzar®). Los antimetabolitos preferidos son la citarabina, la clofarabina y la fludarabina.

45 Los agentes alquilantes ejemplares incluyen, sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, alquilsulfonatos, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethylodopan®, Desmethylodopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), clometina (Mustargen®), ciclofosfamida (Cytosan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ifosfamida (Mitoxana®) melfalán (Alkeran®), clorambucil (Leukeran®), pipobromán (Amedel®, Vercyte®), trietilenemelamina (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), trietilfosforamina, Temozolomida (Temodar®), tiotepa (Thioplex®), busulfán (Busilvex®, Myleran®), carmustina (BiCNU®), lomustina (CeeNU®), estreptozocina (Zanosar®) y dacarbazina (DTIC-Dome®). Otros agentes alquilantes ejemplares incluyen, sin limitación, oxaliplatino (Eloxatin®); temozolomida (Temodar® y Temodal®); dactinomicina (también conocida como actinomicina-D, Cosmegán®); melfalán (también conocido como L-PAM, L-sarcosin y mostaza de fenilalanina, Alkeran®); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Carmustina (BiCNU®); Bendamustina (Treanda®); Busulfán (Busulfex® y Myleran®); Carboplatino (Paraplatin®); Lomustina (también conocida como CCNU, CeeNU®); Cisplatino (también conocido como CDDP, Platinol® y Platinol®-AQ); Clorambucil (Leukeran®); Ciclofosfamida (Cytosan® y Neosar®); Dacarbazina (también conocida como DTIC, DIC y carboxamida de imidazol, DTIC-Dome®); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Ifosfamida (Ifex®); Prednumustina; Procarbazina (Matulane®); Mecloretamina (también conocida como mostaza nitrogenada, mustina y clorhidrato de mecloretamina, Mustargen®); Estreptozocina (Zanosar®); Tiotepa (también conocida como tiofosfoamida, TSPA y TSPA, Thioplex®); Ciclofosfamida (Endoxan®, Cytosan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); y Bendamustina HCl (Treanda®).

60 Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con fludarabina, ciclofosfamida y/o rituximab. Como se describe en el presente

documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR). Como se describe en este documento, el sujeto tiene LLC. Por ejemplo, el sujeto tiene una deleción en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), por ejemplo, en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene un del(17p). Tal como se describe en el presente documento, el sujeto comprende una célula leucémica que tiene una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IgV_H*). Como se describe en el presente documento, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprenda una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IgV_H*). Como se describe en el presente documento, la fludarabina se administra a una dosis de unos 10-50 mg/m² (por ejemplo, unos 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 o 45-50 mg/m²), por ejemplo, por vía intravenosa. Como se describe en el presente documento, la ciclofosfamida se administra a una dosis de aproximadamente 200-300 mg/m² (por ejemplo, aproximadamente 200-225, 225-250, 250-275 o 275-300 mg/m²), por ejemplo, por vía intravenosa. Como se describe en el presente documento, el rituximab se administra a una dosis de aproximadamente 400-600 mg/m² (por ejemplo, 400-450, 450-500, 500-550 o 550-600 mg/m²), por ejemplo, por vía intravenosa.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con bendamustina y rituximab. Como se describe en este documento, el sujeto tiene LLC. Por ejemplo, el sujeto tiene una deleción en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), por ejemplo, en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene un del(17p). Tal como se describe en el presente documento, el sujeto comprende una célula leucémica que tiene una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IgV_H*). Como se describe en el presente documento, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprenda una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IgV_H*). Como se describe en el presente documento, la bendamustina se administra a una dosis de aproximadamente 70-110 mg/m² (por ejemplo, 70-80, 80-90, 90-100 o 100-110 mg/m²), por ejemplo, por vía intravenosa. Como se describe en el presente documento, el rituximab se administra a una dosis de aproximadamente 400-600 mg/m² (por ejemplo, 400-450, 450-500, 500-550 o 550-600 mg/m²), por ejemplo, por vía intravenosa.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y/o un corticosteroide (por ejemplo, prednisona). Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP). Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene un linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene un LDCBG no voluminoso en estadio limitado (por ejemplo, comprende un tumor que tiene un tamaño/diámetro inferior a 7 cm). Como se describe en el presente documento, el sujeto es tratado con radiación en combinación con el R-CHOP. Por ejemplo, al sujeto se le administra R-CHOP (por ejemplo, de 1 a 6 ciclos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos de R-CHOP), seguido de radiación. En algunos casos, se administra al sujeto R-CHOP (por ejemplo, 1-6 ciclos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos de R-CHOP) después de la radiación.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina y/o rituximab. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina y rituximab (EPOCH-R). Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con EPOCH-R ajustado a la dosis (DA-EPOCH-R). Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene un linfoma de células B, por ejemplo, un linfoma agresivo de células B reordenado por Myc.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con rituximab y/o lenalidomida. La lenalidomida ((*RS*)-3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)piperidin-2,6-diona) es un inmunomodulador. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con rituximab y lenalidomida. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene linfoma folicular (FL) o linfoma de células del manto (MCL). Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene FL y no ha sido tratado previamente con una terapia contra el cáncer. Como se describe en el presente documento, la lenalidomida se administra a una dosis de aproximadamente 10-20 mg (por ejemplo, 10-15 o 15-20 mg), por ejemplo, diariamente. Como se describe en el presente documento, el rituximab se administra a una dosis de aproximadamente 350-550 mg/m² (por ejemplo, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 o 475-500 mg/m²), por ejemplo, por vía intravenosa.

Algunos ejemplos de inhibidores de mTOR son, por ejemplo temsirolimus; ridaforolimus (formalmente conocido como deferolimus, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2 [(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R, 23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dietoximetoxi-15,17,21,23, 29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.04,9] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexil dimetilfosfinato, también conocido como AP23573 y MK8669, y descrito en la Publicación PCT n° WO 03/064383); everolimus (Afinitor® o RAD001); rapamicina (AY22989, Sirolimus®); simapimod (CAS 164301-51-3); emsirolimus, (5-{2,4-Bis[(3S)-3-metilmorfolina-4-il]pirido[2,3-d]pirimidina-7-il]-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-Amino-8-[trans-4-(2-hidroxi-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-b]piridino[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502, CAS

1013101-36-4); y N2-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopirano-2-il)morfolino-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicol-L- α -aspartil-L-serina- (SEQ ID NO: 64), sal interior (SF1126, CAS 936487-67-1), y XL765.

Los inmunomoduladores ejemplares incluyen, por ejemplo afutuzumab (disponible en Roche®); pegfilgrastim (Neulasta®); lenalidomida (CC-5013, Revlimid®); talidomida (Thalomid®), actimid (CC4047); e IRX-2 (mezcla de citoquinas humanas que incluye interleucina 1, interleucina 2 e interferón γ , CAS 951209-71-5, disponible en IRX Therapeutics).

Las antraciclinas ejemplares incluyen, por ejemplo doxorubicina (Adriamycin® y Rubex®); bleomicina (lenoxane®); daunorrubicina (clorhidrato de dauorubicina, daunomicina y clorhidrato de rubidomicina, Cerubidine®); daunorrubicina liposomal (citrate de daunorrubicina liposomal, DaunoXome®); mitoxantrona (DHAD, Novantrone®); epirubicina (Ellence™); idarubicina (Idamycin®, Idamycin PFS®); mitomicina C (Mutamycin®); geldanamicina; herbimicina; ravidomicina; y desacetilravidomicina.

Los alcaloides de vinca ejemplares incluyen, por ejemplo, el tartrato de vinorelbina (Navelbine®), la vincristina (Oncovin®) y la vindesina (Eldisine®); la vinblastina (también conocida como sulfato de vinblastina, vincalécoblastina y VLB, Alkaban-AQ® y Velban®); y la vinorelbina (Navelbine®).

Algunos ejemplos de inhibidores del proteosoma son bortezomib (Velcade®) carfilzomib (PX-171-007, (S)-4-Metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)-pentanamida); marizomib (NPI-0052); citrato de ixazomib (MLN-9708); delanzomib (CEP-18770); y *O*-metil-N-[(2-metil-5-tiazolil)carbonil]-L-serinamida (ONX-0912).

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con brentuximab. Brentuximab es un conjugado anticuerpo-fármaco de anticuerpo anti-CD30 y monometil auristatina E. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene linfoma de Hodgkin (LH), por ejemplo, LH en recaída o refractario. Como se describe en el presente documento, el sujeto comprende HL CD30+. Como se describe en el presente documento, el sujeto se ha sometido a un trasplante autólogo de células madre (ASCT). Como se describe en este documento, el sujeto no ha sido sometido a un ASCT. Como se describe en el presente documento, brentuximab se administra a una dosis de aproximadamente 1-3 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5 o 2,5-3 mg/kg), por ejemplo, por vía intravenosa, por ejemplo, cada 3 semanas.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con brentuximab y dacarbazina o en combinación con brentuximab y bendamustina. La dacarbazina es un agente alquilante cuyo nombre químico es 5-(3,3-Dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida. La bendamustina es un agente alquilante cuyo nombre químico es ácido 4-[5-[Bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbenzimidazol-2-il]butanoico. Como se describe en este documento, el sujeto tiene linfoma de Hodgkin (LH). Como se describe en el presente documento, el sujeto no ha sido tratado previamente con una terapia contra el cáncer. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene al menos 60 años de edad, por ejemplo, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o más. Como se describe en el presente documento, la dacarbazina se administra a una dosis de aproximadamente 300-450 mg/m² (por ejemplo, aproximadamente 300-325, 325-350, 350-375, 375-400, 400-425 o 425-450 mg/m²), por ejemplo, por vía intravenosa. Como se describe en el presente documento, la bendamustina se administra a una dosis de aproximadamente 75-125 mg/m² (por ejemplo, 75-100 o 100-125 mg/m², por ejemplo, aproximadamente 90 mg/m²), por ejemplo, por vía intravenosa. En las realizaciones, brentuximab se administra a una dosis de aproximadamente 1-3 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5 o 2,5-3 mg/kg), por ejemplo, por vía intravenosa, por ejemplo, cada 3 semanas.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de CD20, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, un anticuerpo mono o biespecífico anti-CD20) o un fragmento del mismo. Los anticuerpos anti-CD20 ejemplares incluyen, entre otros, rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, veltuzumab, obinutuzumab, TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals), ocaratuzumab y Pro131921 (Genentech). Véase, por ejemplo Lim et al. Haematologica. 95.1(2010):135-43.

Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CD20 comprende rituximab. El rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico ratón/humano IgG1 kappa que se une a CD20 y provoca la citólisis de una célula que expresa CD20, por ejemplo, como se describe en www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s53111b1.pdf. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con rituximab. Como se describe en este documento, el sujeto tiene LLC o SLL.

Como se describe en el presente documento, el rituximab se administra por vía intravenosa, por ejemplo, como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada infusión proporciona unos 500-2000 mg (por ejemplo, unos 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800, 1800-1900, o 1900-2000 mg) de rituximab. Como se describe en el presente documento, el rituximab se administra a una dosis de 150 mg/m² a 750 mg/m², por ejemplo aproximadamente 150-175 mg/m², 175-200 mg/m², 200-225 mg/m², 225-250 mg/m², 250-300 mg/m², 300-325

mg/m², 325-350 mg/m², 350-375 mg/m², 375-400 mg/m², 400-425 mg/m², 425-450 mg/m², 450-475 mg/m², 475-500 mg/m², 500-525 mg/m², 525-550 mg/m², 550-575 mg/m², 575-600 mg/m², 600-625 mg/m², 625-650 mg/m², 650-675 mg/m², o 675-700 mg/m², donde m² indica la superficie corporal del sujeto. Como se describe en el presente documento, el rituximab se administra en un intervalo de dosificación de al menos 4 días, por ejemplo, 4, 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, el rituximab se administra en un intervalo de dosificación de al menos 0,5 semanas, por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas, o más. Como se describe en el presente documento, el rituximab se administra a una dosis e intervalo de dosificación descritos en el presente documento durante un periodo de tiempo, por ejemplo, al menos 2 semanas, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 semanas, o más. Por ejemplo, el rituximab se administra a una dosis e intervalo de dosificación descritos en el presente documento para un total de al menos 4 dosis por ciclo de tratamiento (por ejemplo, al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o más dosis por ciclo de tratamiento).

Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CD20 comprende ofatumumab. Ofatumumab es un anticuerpo monoclonal humano anti-CD20 IgG1k con un peso molecular de aproximadamente 149 kDa. Por ejemplo, el ofatumumab se genera mediante tecnología de ratones transgénicos e hibridomas y se expresa y purifica a partir de una línea celular murina recombinante (NS0). Véase, por ejemplo, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/1253261b1.pdf; y los números de identificación de ensayos clínicos NCT01363128, NCT01515176, NCT01626352 y NCT01397591. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con ofatumumab. En las realizaciones, el sujeto tiene CLL o SLL.

Como se describe en el presente documento, ofatumumab se administra como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada infusión proporciona unos 150-3000 mg (por ejemplo, aproximadamente 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1200, 1200-1400, 1400-1600, 1600-1800, 1800-2000, 2000-2200, 2200-2400, 2400-2600, 2600-2800, o 2800-3000 mg) de ofatumumab. Como se describe en el presente documento, ofatumumab se administra a una dosis inicial de aproximadamente 300 mg, seguida de 2000 mg, por ejemplo, durante aproximadamente 11 dosis, por ejemplo, durante 24 semanas. Como se describe en el presente documento, ofatumumab se administra en un intervalo de dosificación de al menos 4 días, por ejemplo, 4, 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, ofatumumab se administra en un intervalo de dosificación de al menos 1 semana, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 30, 22, 24, 26, 28, 30 semanas, o más. Como se describe en el presente documento, ofatumumab se administra a una dosis e intervalo de dosificación descritos en el presente documento durante un periodo de tiempo, por ejemplo, al menos 1 semana, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 semanas o más, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, o 1, 2, 3, 4, 5 años o más. Por ejemplo, ofatumumab se administra a una dosis e intervalo de dosificación descritos en el presente documento para un total de al menos 2 dosis por ciclo de tratamiento (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20 o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende ocrelizumab. Ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20, por ejemplo, como se describe en los ensayos clínicos NCT00077870, NCT01412333, NCT00779220, NCT00673920, NCT01194570, y Kappos et al. *Lancet*. 19.378(2011):1779-87.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende veltuzumab. Veltuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el CD20. Véase, por ejemplo, el identificador de ensayo clínico n° NCT00547066, NCT00546793, NCT01101581 y Goldenberg et al. *Linfoma de leucemia*. 51(5)(2010):747-55.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende GA101. El GA101 (también llamado obinutuzumab o RO5072759) es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado y glucosado. Véase, por ejemplo Robak. *Curr. Opin. Invest. Las drogas*. 10.6(2009):588-96. Números de identificación de ensayos clínicos: NCT01995669, NCT01889797, NCT02229422 y NCT01414205; y www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s0001b1.pdf.

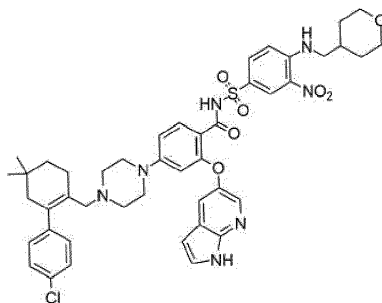
En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende AME-133v. El AME-133v (también llamado LY2469298 u ocaratuzumab) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado contra el CD20 con mayor afinidad por el receptor FcγRIIIa y una mayor actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en comparación con el rituximab. Véase, por ejemplo Robak et al. *BioDrugs* 25.1(2011):13-25y Forero-Torres et al. *Clin Cancer Res*. 18.5(2012):1395-403.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende PRO131921. El PRO131921 es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20 diseñado para tener una mejor unión a FcγRIIIa y una mejor ADCC en comparación con el rituximab. Véase, por ejemplo Robak et al. *BioDrugs* 25.1(2011): 13-25y Casulo et al. *Clin Immunol*. 154.1(2014):37-46; y Clinical Trial Identifier n° NCT00452127.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende TRU-015. TRU-015 es una proteína de fusión anti-CD20 derivada de dominios de un anticuerpo contra CD20. El TRU-015 es más pequeño que los anticuerpos monoclonales, pero conserva las funciones efectoras mediadas por Fc. Véase, por ejemplo Robak et al. *BioDrugs* 25.1(2011): 13-25. TRU-015 contiene un fragmento variable de cadena única (scFv) anti-CD20 unido a los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la IgG1 humana, pero carece de los dominios CHI y CL.

Como se describe en el presente documento, un anticuerpo anti-CD20 descrito en el presente documento se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico (por ejemplo, citoxan, fludarabina, inhibidor de la histona desacetilasa, agente desmetilante, vacuna peptídica, antibiótico antitumoral, inhibidor de la tirosina quinasa, agente alquilante, agente antimicrotúbulo o antimitótico), agente antialérgico, agente antinaúseas (o antiemético), analgésico o agente citoprotector descrito en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor del linfoma de células B 2 (BCL-2) (por ejemplo, venetoclax, también llamado ABT-199 o GDC-0199;) y/o rituximab. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con venetoclax y rituximab. Venetoclax es una pequeña molécula que inhibe la proteína antiapoptótica BCL-2. La estructura de venetoclax (4-(4-[[2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il] metil] piperazin-1-il)-N-({3 -nitro-4-[(tetrahidro-2H-piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonil)-2-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamida) se muestra a continuación.



Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene LLC. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene LLC recidivante, por ejemplo, el sujeto ha recibido previamente una terapia contra el cáncer. Como se describe en el presente documento, el venetoclax se administra a una dosis de aproximadamente 15-600 mg (por ejemplo, 15-20, 20-50, 50-75, 75-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500 o 500-600 mg), por ejemplo, diariamente. Como se describe en el presente documento, el rituximab se administra a una dosis de aproximadamente 350-550 mg/m² (por ejemplo, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 o 475-500 mg/m²), por ejemplo, por vía intravenosa, por ejemplo, mensualmente.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra en combinación con un virus oncolítico. Tal y como se describe en el presente documento, los virus oncolíticos son capaces de replicarse selectivamente en una célula cancerosa y provocar su muerte o ralentizar su crecimiento. En algunos casos, los virus oncolíticos no tienen ningún efecto o un efecto mínimo en las células no cancerosas. Un virus oncolítico incluye, entre otros, un adenovirus oncolítico, un virus del herpes simple oncolítico, un retrovirus oncolítico, un parvovirus oncolítico, un virus vaccinia oncolítico, un virus Sinbis oncolítico, un virus de la gripe oncolítico o un virus de ARN oncolítico (por ejemplo, reovirus oncolítico, virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) oncolítico, virus del sarampión oncolítico o virus de la estomatitis vesicular (VSV) oncolítico).

Como se describe en el presente documento, el virus oncolítico es un virus, por ejemplo, un virus oncolítico recombinante, descrito en US2010/0178684 A1. Como se describe en el presente documento, un virus oncolítico recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico heteróloga) que codifica un inhibidor de una respuesta inmunitaria o inflamatoria, por ejemplo, como se describe en US2010/0178684 A1. Como se describe en el presente documento, el virus oncolítico recombinante, por ejemplo, el NDV oncolítico, comprende una proteína proapoptótica (por ejemplo, apoptina), una citoquina (por ejemplo, GM-CSF, interferón-gamma, interleucina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral-alfa), una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo contra la fibronectina ED-B), un antígeno asociado al tumor, una proteína adaptadora biespecífica (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un fragmento de anticuerpo dirigido contra la proteína HN del VEN y un receptor coestimulador de células T, como CD3 o CD28; o una proteína de fusión entre la IL-2 humana y un anticuerpo de cadena única dirigido contra la proteína HN del VEN). Véase, por ejemplo Zamarin et al. Future Microbiol. 7.3(2012):347-67. Como se describe en el presente documento, el virus oncolítico es un NDV oncolítico quimérico descrito en US 8591881 B2, US 2012/0122185 A1 o US 2014/0271677 A1.

Como se describe en el presente documento, el virus oncolítico comprende un adenovirus condicionalmente replicativo (CRAd), que está diseñado para replicarse exclusivamente en células cancerosas. Véase, por ejemplo Alemany et al. Nature Biotechnol. 18(2000):723-27. Como se describe en el presente documento, un adenovirus oncolítico comprende uno de los descritos en la Tabla 1 de la página 725 de Alemany et al.

Los virus oncolíticos ejemplares incluyen, entre otros, los siguientes:

Adenovirus oncolítico del grupo B (ColoAd1) (PsiOxus Therapeutics Ltd.) (véase, por ejemplo, Clinical Trial Identifier: NCT02053220);

ONCOS-102 (antes llamado CGTG-102), que es un adenovirus que comprende el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Oncos Therapeutics) (véase, por ejemplo, Clinical Trial Identifier: NCT01598129);

5 VCN-01, que es un adenovirus humano oncolítico modificado genéticamente que codifica la hialuronidasa humana PH20 (VCN Biosciences, S.L.) (véase, por ejemplo, Clinical Trial Identifiers: NCT02045602 y NCT02045589);

10 Adenovirus de replicación condicional ICOVIR-5, que es un virus derivado del adenovirus humano de tipo salvaje del serotipo 5 (Had5) que ha sido modificado para replicarse selectivamente en células cancerosas con una vía de retinoblastoma/E2F desregulada (Institut Català d'Oncologia) (véase, por ejemplo, Clinical Trial Identifier: NCT01864759);

Celyvir, que comprende células madre mesenquimales (MSC) autólogas derivadas de la médula ósea e infectadas con ICOVIR5, un adenovirus oncolítico (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, España/Ramón Alemany) (véase, por ejemplo, Clinical Trial Identifier: NCT01844661);

15 CG0070, que es un adenovirus oncolítico de serotipo 5 (Ad5) de replicación condicionada en el que el promotor humano E2F-1 impulsa la expresión de los genes virales esenciales E1a, restringiendo así la replicación viral y la citotoxicidad a las células tumorales defectuosas de la vía Rb (Cold Genesys, Inc.) (véase, por ejemplo, Clinical Trial Identifier: NCT02143804); o

20 DNX-2401 (antes llamado Delta-24-RGD), que es un adenovirus que ha sido diseñado para replicarse selectivamente en células deficientes en la vía del retinoblastoma (Rb) y para infectar células que expresan ciertas integrinas de unión a RGD de forma más eficiente (Clínica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/ DNATRIX, Inc.) (véase, por ejemplo, Clinical Trial Identifier: NCT01956734).

25 Como se describe en el presente documento, un virus oncolítico descrito en el presente documento se administra por inyección, por ejemplo, subcutánea, intraarterial, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Como se describe en el presente documento, un virus oncolítico descrito en el presente documento se administra por vía intratumoral, transdérmica, transmucosa, oral, intranasal o por vía pulmonar.

30 Como se describe en el presente documento, las células que expresan un CAR descrito en el presente documento se administran a un sujeto en combinación con una molécula que disminuye la población de células T_{reg} . Los procedimientos que disminuyen el número de células T_{reg} (por ejemplo, agotan) son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el agotamiento de CD25, la administración de ciclofosfamida, la modulación de la función G1TR. Sin querer estar limitado por la teoría, se cree que la reducción del número de células T_{reg} en un sujeto antes de la aféresis o antes de la administración de una célula que exprese CAR descrita en el presente documento reduce el número de células inmunitarias no deseadas (por ejemplo, T_{reg} s) en el microambiente del tumor y reduce el riesgo de recaída del sujeto.

35 Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con una molécula dirigida a G1TR y/o que modula las funciones de G1TR, como un agonista de G1TR y/o un anticuerpo de G1TR que agota las células T reguladoras (T_{reg} s). Como se describe en el presente documento, las células que expresan un CAR descrito en el presente documento se administran a un sujeto en combinación con ciclofosfamida. Como se describe en el presente documento, las moléculas de unión a G1TR y/o las moléculas que modulan las funciones de G1TR (por ejemplo, agonistas de G1TR y/o anticuerpos depletadores de T_{reg}) se administran antes de la administración de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, el agonista G1TR puede administrarse antes de la aféresis de las células. Como se describe en el presente documento, la ciclofosfamida se administra al sujeto antes de la administración (por ejemplo, infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. Como se describe en el presente documento, la ciclofosfamida y un anticuerpo anti-G1TR se administran al sujeto antes de la administración (por ejemplo, infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene cáncer (por ejemplo, un cáncer sólido o un cáncer hematológico como la LLA o la LLC). Como se describe en este documento, el sujeto tiene LLC. Como se describe en este documento, el sujeto tiene TODOS. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene un cáncer sólido, por ejemplo, un cáncer sólido descrito en el presente documento. Los agonistas de G1TR ejemplares incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de G1TR y anticuerpos anti-G1TR (por ejemplo, anticuerpos bivalentes anti-G1TR) como, por ejemplo, una proteína de fusión de G1TR descrita en la Patente de EE.UU. n°: 6,111,090, Patente europea n°: 090505B1, Patente de EE.UU. n°: 8,586,023, Publicación PCT n°: WO 2010/003118 y 2011/090754o un anticuerpo anti-G1TR descrito, por ejemplo, en Patente de los Estados Unidos No: 7,025,962, Patente Europea No: 1947183B1, Patente de los Estados Unidos No: 7,812,135, Patente de EE.UU. n°: 8,388,967, Patente de EE.UU. n°: 8,591,886, Patente Europea No: EP 1866339, Publicación PCT No: WO 2011/028683, Publicación PCT n°:WO 2013/039954, Publicación del PCT n°: WO2005/007190, Publicación PCT No: WO 2007/133822, Publicación PCT No: WO2005/055808, Publicación PCT No: WO 99/40196, Publicación PCT No: WO 2001/03720, Publicación PCT No: WO99/20758, Publicación PCT No: WO2006/083289, Publicación PCT No: WO 2005/115451, Patente de EE.UU. n°: 7,618,632 y Publicación PCT No: WO 2011/051726.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un agonista G1TR, por ejemplo, un agonista G1TR descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, el agonista del G1TR se administra antes de la célula que expresa el CAR. Por ejemplo, el agonista G1TR puede administrarse antes de la aféresis de las células.

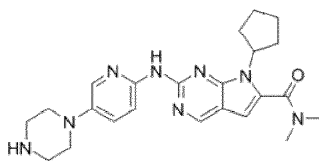
5 Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor de mTOR descrito en el presente documento, por ejemplo, un rapálogo como everolimus. Como se describe en el presente documento, el inhibidor de mTOR se administra antes de la célula que expresa el CAR. Por ejemplo, en una realización, el inhibidor de mTOR puede administrarse antes de la aféresis de las células.

10 Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa, por ejemplo, un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa es un inhibidor de SHP-1, por ejemplo, un inhibidor de SHP-1 descrito en el presente documento, como, por ejemplo, estibogluconato de sodio. Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa es un inhibidor de la SHP-2.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede utilizarse en combinación con un inhibidor de quinasa. Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de la CDK4, por ejemplo, un inhibidor de la CDK4 descrito en el presente documento, por ejemplo, un inhibidor de la CD4/6, como, por ejemplo 6-Acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-il-amino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, clorhidrato (también denominado palbociclib o PD0332991). En una realización, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de BTK, por ejemplo, un inhibidor de BTK descrito en el presente documento, como, por ejemplo, ibrutinib. Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor de mTOR descrito en el presente documento, como, por ejemplo, rapamicina, un análogo de rapamicina, OSI-027. El inhibidor de mTOR puede ser, por ejemplo, un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2, por ejemplo, un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2 descritos en el presente documento. Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de MNK, por ejemplo, un inhibidor de MNK descrito en el presente documento, como, por ejemplo, 4-amino-5-(4-fluoroanilino)-pirazolo [3,4-d] pirimidina. El inhibidor de MNK puede ser, por ejemplo, un inhibidor de MNK1a, MNK1b, MNK2a y/o MNK2b. Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de DGK, por ejemplo, un inhibidor de DGK descrito en el presente documento, como, por ejemplo, DGK α 1 (D5919) o DGK α 2 (D5794). Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de la CDK4 seleccionado entre aloisina A; flavopiridol o HMR-1275, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(3S,4R)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-4-cromenona; crizotinib (PF-02341066; 2-(2-Clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(2R,3S)-2-(hidroximetil)-1-metil-3-pirrolidinil]-4H-1-benzopiran-4-ona, clorhidrato (P276-00); 1-metil-5-[[2-[5-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il]-4-piridinil]oxi]-N-[4-(trifluorometil)fenil]-1H-benzimidazol-2-amina (RAF265); indisulam (E7070); roscovitina (CYC202); palbociclib (PD0332991); dinaciclib (SCH727965); N-[5-[[[(5-tert-butiloxazol-2-il)metil]tio]tiazol-2-il]piperidin-4-carboxamida (BMS 387032); ácido 4-[[9-cloro-7-(2,6-difluorofenil)-5H-pirimido[5,4-d][2]benzazepin-2-il]amino]-benzoico (MLN8054); 5-[3-(4,6-difluoro-1H-benzimidazol-2-il)-1H-indazol-5-il]-N-etil-4-metil-3-piridinemetanamina (AG-024322); ácido N-(piperidin-4-il)amida 4-(2,6-diclorobenzoilamino)-1H-pirazol-3-carboxílico (AT7519); 4-[2-metil-1-(1-metiletil)-1H-imidazol-5-il]-N-[4-(metilsulfonil)fenil]-2-pirimidinamina (AZD5438); y XL281 (BMS908662).

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

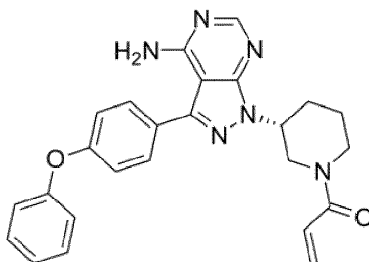
Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) 4 o 6, por ejemplo, un inhibidor de CDK4 o un inhibidor de CDK6 descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de CDK4/6 (por ejemplo, un inhibidor que se dirige tanto a CDK4 como a CDK6), por ejemplo, un inhibidor de CDK4/6 descrito en el presente documento. Como se describe en este documento, el sujeto tiene MCL. El MCL es un cáncer agresivo que responde mal a las terapias actualmente disponibles, es decir, esencialmente incurable. En muchos casos de MCL, la ciclina D1 (un regulador de CDK4/6) se expresa (por ejemplo, debido a una translocación cromosómica que implica a los genes de inmunoglobulina y ciclina D1) en las células de MCL. Por lo tanto, sin estar limitado por la teoría, se piensa que las células MCL son altamente sensibles a la inhibición de CDK4/6 con alta especificidad (es decir, un efecto mínimo en las células inmunes normales). Los inhibidores de CDK4/6 por sí solos han tenido cierta eficacia en el tratamiento de la MCL, pero sólo han logrado una remisión parcial con una alta tasa de recaídas. Un inhibidor ejemplar de la CDK4/6 es el LEE011 (también llamado ribociclib), cuya estructura se muestra a continuación.



Sin estar limitado por la teoría, se cree que la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento con un inhibidor de CDK4/6 (por ejemplo, LEE011 u otro inhibidor de CDK4/6 descrito en el presente documento) puede lograr una mayor capacidad de respuesta, por ejemplo, con mayores tasas de remisión y/o menores tasas de recaída, por ejemplo, en comparación con un inhibidor de CDK4/6 solo.

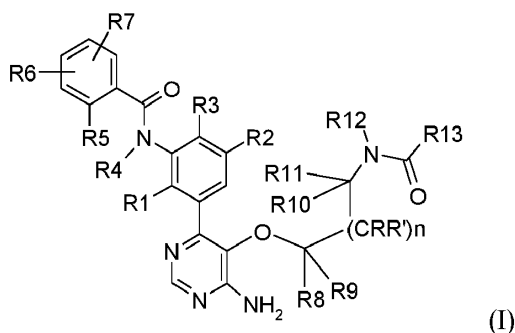
Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de la BTK seleccionado entre ibrutinib (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13. Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la BTK no reduce ni inhibe la actividad quinasa de la quinasa inducible por interleucina 2 (ITK), y se selecciona entre GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13.

Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de la BTK, por ejemplo, ibrutinib (PCI-32765). Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib). Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con ibrutinib (también llamado PCI-32765). A continuación se muestra la estructura del ibrutinib (1-[(3R)-3-[4-Amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona).



Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene LLC, linfoma de células del manto (LCM) o linfoma linfocítico pequeño (LPL). Por ejemplo, el sujeto tiene una delección en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), por ejemplo, en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene un del(17p). Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene LLC o SLL en recaída, por ejemplo, al sujeto se le ha administrado previamente una terapia contra el cáncer (por ejemplo, se le ha administrado previamente una, dos, tres o cuatro terapias contra el cáncer anteriores). Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene LLC o SLL refractaria. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene linfoma folicular, por ejemplo, linfoma folicular en recaída o refractario. Como se describe en el presente documento, el ibrutinib se administra a una dosis de unos 300-600 mg/día (por ejemplo, unos 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550 o 550-600 mg/día, por ejemplo, unos 420 mg/día o unos 560 mg/día), por ejemplo, por vía oral. Como se describe en el presente documento, el ibrutinib se administra a una dosis de aproximadamente 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 420 mg, 440 mg, 460 mg, 480 mg, 500 mg, 520 mg, 540 mg, 560 mg, 580 mg, 600 mg (por ejemplo, 250 mg, 420 mg o 560 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante un ciclo de 21 días, o diariamente durante un ciclo de 28 días. Como se describe en el presente documento, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de ibrutinib. Como se describe en el presente documento, el ibrutinib se administra en combinación con rituximab. Véase, por ejemplo, Burger et al. (2013) Ibrutinib en combinación con rituximab (iR) es bien tolerado e induce una alta tasa de remisiones duraderas en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) de alto riesgo: New, Updated Results Of a Phase II Trial In 40 Patients, Abstract 675 presented at 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA 7-10 Dec. Sin estar limitado por la teoría, se piensa que la adición de ibrutinib aumenta la respuesta proliferativa de las células T y puede cambiar las células T de un fenotipo T-helper-2 (Th2) a T-helper-1 (Th1). Th1 y Th2 son fenotipos de células T auxiliares, y Th1 y Th2 dirigen diferentes vías de respuesta inmunitaria. Un fenotipo Th1 se asocia con respuestas proinflamatorias, por ejemplo, para matar células, como patógenos/virus intracelulares o células cancerosas, o para perpetuar respuestas autoinmunes. Un fenotipo Th2 se asocia con la acumulación de eosinófilos y las respuestas antiinflamatorias.

Como se describe en el presente documento, el inhibidor de BTK es un inhibidor de BTK descrito en la solicitud internacional WO/2015/079417. Por ejemplo, el inhibidor de BTK es un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;



en la que,

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

Como se describe en el presente documento, el inhibidor de BTK de Fórmula I se elige entre: N-(3-(5-((1-Acilo-zetidina-3-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (E)-N-(3-(6-Amino-5-((1-(but-2-enoil)azetidina-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-benzamidafluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-((1-(but-2-enoil)azetidina-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-((1-(but-2-enoil)azetidina-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-((1-Aciloilpiperidin-4-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilacrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (E)-N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilpropilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (E)-N-(3-(6-Amino-5-(2-(4-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilbut-2-ynamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(2-((4-Amino-6-(3-(4-ciclopropil-2-fluorobenzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)pirimidina-5-il)oxi)-N-metiloxirano-2-carboxamida); N-(2-((4-Amino-6-(3-(6-ciclopropil-8-fluoro-1-oxisoquinolina-2(1H)-il)fenil)pirimidin-5-il)oxi)-N-metilacrilamida); N-(3-(5-(2-Acrlamidoetoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-etilacrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-(2-fluoroetil)acrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-((1-Acrlamidociclopropilo)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(5-(2-Acrlamidopropoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-Amino-5-(2-(but-2-inamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilacrilamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilbut-2-inamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(3-(N-metilacrilamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-

N-(3-(5-((1-Aciloilpirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-Amino-5-((1-(but-2-inoil)pirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-2-(3-(5-((1-Aciloilpirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona; N-(2-((4-Amino-6-(3-(6-ciclopropil-1-oxo-3,4-dihidroisoquinolina-2(1H)-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-N-metilacrilamida; N-(3-(5-((2S,4R)-1-Aciloil-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-((2S,4R)-1-(but-2-inoil)-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; 2-(3-(5-((2S,4R)-1-Aciloil-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona; N-(3-(5-((2S,4S)-1-Aciloil-4-metoxipirrolidina-2-il)metoxi)-6-aminopirimidina-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-((2S,4S)-1-(but-2-inoil)-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-((2S,4R)-1-Aciloil-4-fluoropirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-((2S,4R)-1-(but-2-inoil)-4-fluoropirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(5-((1-Aciloilazetidina-2-il)etoximetoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-Amino-5-((1-propiloilazetidina-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-2-(3-(5-((1-Aciloilazetidina-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona; (R)-N-(3-(5-((1-Aciloilazetidina-2-il)etoximetoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (R)-N-(3-(5-((1-Aciloilpiperidin-3-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-((2R,3S)-1-Aciloil-3-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-((2S,4R)-1-Aciloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; o N-(3-(5-((2S,4S)-1-Aciloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

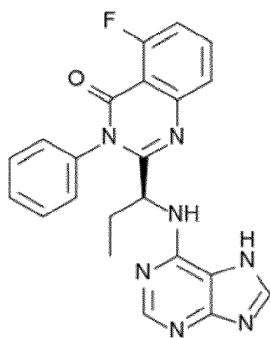
A menos que se indique lo contrario, los términos químicos utilizados anteriormente para describir el inhibidor de BTK de Fórmula I se utilizan según sus significados, tal como se establece en Solicitud Internacional WO/2015/079417.

Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de mTOR seleccionado entre temsirolimus ridaforolimus (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[[1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R]-1,18-dihidroxi-19,30-dietoximetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-penta-oxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.04.9]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexil dimetilfosfinato, también conocido como AP23573 y MK8669; everolimus (RAD001) rapamicina (AY22989); simapimod; (5-{2,4-bis[(3S)-3-metilmorfolina-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-mmino-8-[trans-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-etoximetoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502); y N2-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopirano-2-il)morfolino-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicina-L- α -aspartil-L-serina- (SEQ ID NO: 64), sal interior (SF1126); y XL765.

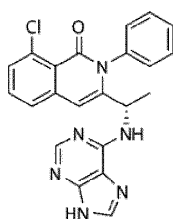
Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, rapamicina, y la rapamicina se administra a una dosis de aproximadamente 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg (por ejemplo, 6 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo,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

Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de la MNK seleccionado entre CGP052088; 4-amino-3-(p-fluorofenilamino)-pirazolo [3,4-d] pirimidina (CGP57380); cercosporamida; ETC-1780445-2; y 4-amino-5-(4-fluoroanilino)-pirazolo [3,4-d] pirimidina.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) (por ejemplo, un inhibidor de PI3K descrito en el presente documento, por ejemplo, idelalisib o duvelisib) y/o rituximab. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con idelalisib y rituximab. Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con duvelisib y rituximab. Idelalisib (también llamado GS-1101 o CAL-101; Gilead) es una pequeña molécula que bloquea la isoforma delta de la PI3K. La estructura del idelalisib (5-Fluoro-3-fenil-2-[(1S)-1-(7H-purina-6-ilamino)propil]-4(3H)-quinazolinona) se muestra a continuación.



El duvelisib (también llamado IPI-145; Infinity Pharmaceuticals y Abbvie) es una pequeña molécula que bloquea la PI3K- δ , γ . A continuación se muestra la estructura del duvelisib (8-cloro-2-fenil-3-[(1S)-1-(9H-purina-6-ilamino)etil]-1(2H)-isoquinolinona).



5

Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene LLC. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene LLC en recaída, por ejemplo, el sujeto ha recibido previamente una terapia contra el cáncer (por ejemplo, se le ha administrado previamente un anticuerpo anti-CD20 o se le ha administrado previamente ibrutinib). Por ejemplo, el sujeto tiene una delección en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), por ejemplo, en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene un del(17p). Tal como se describe en el presente documento, el sujeto comprende una célula leucémica que tiene una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IgV_H*). Como se describe en el presente documento, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprenda una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IgV_H*). Como se describe en este documento, el sujeto tiene una delección en el brazo largo del cromosoma 11 (del(11q)). En otras realizaciones, el sujeto no tiene un del(11q). Como se describe en el presente documento, el idelalisib se administra a una dosis de aproximadamente 100-400 mg (por ejemplo, 100-125, 125-150, 150-175, 175-200, 200-225, 225-250, 250-275, 275-300, 325-350, 350-375, o 375-400 mg), por ejemplo, BID. Como se describe en el presente documento, el duvelisib se administra a una dosis de unos 15-100 mg (por ejemplo, unos 15-25, 25-50, 50-75 o 75-100 mg), por ejemplo, dos veces al día. Como se describe en el presente documento, el rituximab se administra a una dosis de aproximadamente 350-550 mg/m² (por ejemplo, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 o 475-500 mg/m²), por ejemplo, por vía intravenosa.

Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor dual de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y de mTOR seleccionado de 2-Amino-8-[trans-4-(2-hidroxi-etoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirimidin-7(8H)-ona (PF-04691502); N-[4-[[4-(Dimetilamino)-1-piperidinil]carbonil]fenil]-N'-[4-(4,6-di-4-morfolinil-1,3,5-triazin-2-il)fenil]urea (PF-05212384, PKI-587); 2-Metil-2-{4-[3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]fenil}propanonitrilo (BEZ-235); apitolisib (GDC-0980, RG7422); 2,4-Difluoro-N-{2-(metiloxi)-5-[4-(4-piridazinil)-6-quinolinil]-3-piridinil}bencenosulfonamida (GSK2126458); ácido maleico de 8-(6-metoxipiridin-3-il)-3-metil-1-(4-(piperazin-1-il)-3-(trifluorometil)fenil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2(3H)-ona (NVP-BGT226); 3-[4-(4-Morfolinil)pirido[3',2':4,5]furo[3,2-d]pirimidin-2-il]fenol(PI-103); 5-(9-isopropil-8-metil-2-morfolino-9H-purin-6-il)pirimidin-2-amina (VS-5584, SB2343); y N-[2-[(3,5-Dimetoxifenil)amino]quinoxalina-3-il]-4-[[4-metil-3-metoxifenil]carbonil]aminofenilsulfonamida (XL765).

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK). Los ejemplos de quinasas ALK incluyen, entre otros, crizotinib (Pfizer), ceritinib (Novartis), alectinib (Chugai), brigatinib (también llamado AP26113; Ariad), entrectinib (Ignyta), PF-06463922 (Pfizer), TSR-011 (Tesar) (véase, por ejemplo, el Identificador de ensayo clínico n° NCT02048488), CEP-37440 (Teva) y X-396 (Xcovery). Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene un cáncer sólido, por ejemplo, un cáncer sólido descrito en el presente documento, por ejemplo, cáncer de pulmón.

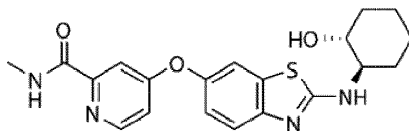
El nombre químico del crizotinib es 3-[(1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi]-5-(1-piperidin-4-ilpirazol-4-il)piridin-2-amina. El nombre químico del ceritinib es 5-cloro-N2-[2-isopropoxi-5-metil-4-(4-piperidinil)fenil]-N4-[2-(isopropilsulfonil)fenil]-2,4-pirimidinediamina. El nombre químico del alectinib es 9-etil-6,6-dimetil-8-(4-morfolinopiperidin-1-il)-11-oxo-6,11-dihidro-5H-benzo[b]carbazol-3-carbonitrilo. El nombre químico del brigatinib es 5-cloro-N2-{4-[4-(dimetilamino)-1-piperidinil]-2-metoxifenil}-N4-[2-(dimetilfosforil)fenil]-2,4-pirimidinediamina. El nombre

químico del entrectinib es N-(5-(3,5-difluorobencil)-1H-indazol-3-il)-4-(4-metilpiperazin-1-il)-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)benzamida. El nombre químico del PF-06463922 es (10R)-7-Amino-12-fluoro-2,10,16-trimetil-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(meteno)pirazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazacicotetradecin-3-carbonitrilo. La estructura química del CEP-37440 es (S)-2-((5-cloro-2-((6-(4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il)-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzo[7]annulen-2-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-N-metilbenzamida. El nombre químico del X-396 es (R)-6-amino-5-(1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi)-N-(4-(4-metilpiperazin-1-carbonil)fenil)piridazina-3-carboxamida.

Fármacos que inhiben la fosfatasa dependiente del calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina). (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991 Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991 Bierer et al., Curr. Opin. Inmune. 5:763-773, 1993) también puede utilizarse. Las composiciones celulares de la presente divulgación pueden administrarse a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) un trasplante de médula ósea, una terapia ablativa de células T con agentes quimioterapéuticos como la fludarabina, la radioterapia de haz externo (XRT), la ciclofosfamida, y/o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. Las composiciones celulares de la presente divulgación se administran tras una terapia ablativa de células B, como los agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con altas dosis de quimioterapia seguido de un trasplante de células madre de sangre periférica. Como se describe en el presente documento, tras el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente divulgación. Como se describe en este documento, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). La IDO es una enzima que cataliza la degradación del aminoácido L-triptófano a cinurenina. Muchos cánceres sobreexpresan la IDO, por ejemplo, el cáncer de próstata, colorrectal, de páncreas, de cuello de útero, gástrico, de ovarios, de cabeza y de pulmón. Los pDC, los macrófagos y las células dendríticas (DC) pueden expresar la IDO. Sin estar limitado por la teoría, se cree que una disminución del L-triptófano (por ejemplo, catalizada por la IDO) da lugar a un medio inmunosupresor al inducir la anergia de las células T y la apoptosis. Así, sin estar limitado por la teoría, se piensa que un inhibidor de IDO puede mejorar la eficacia de una célula que exprese CAR descrita en el presente documento, por ejemplo, disminuyendo la supresión o la muerte de una célula inmunitaria que exprese CAR. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene un tumor sólido, por ejemplo, un tumor sólido descrito en el presente documento, por ejemplo, cáncer de próstata, colorrectal, de páncreas, de cuello uterino, gástrico, de ovario, de cabeza o de pulmón. Algunos ejemplos de inhibidores de la IDO son, entre otros, el 1-metil-triptófano, el indoximod (NewLink Genetics) (véanse, por ejemplo, IClinical Trial Identifier NCT01191216 y NCT01792050) y el INCB024360 (Incyte Corp.) (véanse, por ejemplo, Clinical Trial Identifier NCT01604889 y NCT01685255)

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un modulador de las células supresoras derivadas de los mieloides (MDSC). Las MDSC se acumulan en la periferia y en la zona del tumor de muchos tumores sólidos. Estas células suprimen las respuestas de las células T, dificultando así la eficacia de la terapia celular con expresión CAR. Sin estar limitado por la teoría, se cree que la administración de un modulador de MDSC mejora la eficacia de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene un tumor sólido, por ejemplo, un tumor sólido descrito en el presente documento, por ejemplo, un glioblastoma. Los moduladores ejemplares de las MDSC incluyen, entre otros, el MCS110 y el BLZ945. MCS110 es un anticuerpo monoclonal (mAb) contra el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Véase, por ejemplo, eClinical Trial Identifier nº NCT00757757. BLZ945 es una pequeña molécula inhibidora del receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1R). Véase, por ejemplo Pyontek et al. Nat. Med. 19(2013): 1264-72. La estructura de BLZ945 se muestra a continuación.



Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un agente que inhibe o reduce la actividad de las células plasmáticas inmunosupresoras. Se ha demostrado que las células plasmáticas inmunosupresoras impiden la quimioterapia inmunogénica dependiente de las células T, como el oxaliplatino (Shalapour et al., Nature 2015, 521:94-101). Como se describe en el presente documento, las células plasmáticas inmunosupresoras pueden expresar una o más de las IgA, la interleucina (IL)-10 y la PD-L1. Como se describe en el presente documento, el agente es una célula que expresa CD19 CAR o una célula que expresa BCMA CAR.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un polipéptido de interleucina-15 (IL-15), un polipéptido del receptor alfa de interleucina-15 (IL-15Ra) o una combinación de ambos polipéptidos de IL-15 y de IL-15Ra, por ejemplo, hetIL-15 (Admune Therapeutics, LLC). hetIL-15 es un complejo heterodimérico no covalente de IL-15 e IL-15Ra. hetIL-15 se describe en, por ejemplo U.S. 8,124,084, U.S. 2012/0177598, U.S. 2009/0082299, U.S. 2012/0141413y EE.UU. 2011/0081311. Como se describe en el presente documento, el het-IL-15 se administra por vía subcutánea. Como se

describe en el presente documento, el sujeto tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer sólido, por ejemplo, un melanoma o un cáncer de colon. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene un cáncer metastásico.

Como se describe en el presente documento, a un sujeto que tiene una enfermedad descrita en el presente documento, por ejemplo, un trastorno hematológico, por ejemplo, LMA o SMD, se le administra una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un agente, por ejemplo, un agente citotóxico o quimioterapéutico, una terapia biológica (por ejemplo, un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, o una terapia celular), o un inhibidor (por ejemplo, un inhibidor de quinasa). Como se describe en el presente documento, se administra al sujeto una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un agente citotóxico, por ejemplo, CPX-351 (Celator Pharmaceuticals), citarabina, daunorubicina, vosaroxina (Sunesis Pharmaceuticals), sapacitabina (Cyclacel Pharmaceuticals), idarubicina o mitoxantrona. El CPX-351 es una formulación liposomal que comprende citarabina y daunorubicina en una relación molar de 5:1. Como se describe en el presente documento, se administra al sujeto una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un agente hipometilante, por ejemplo, un inhibidor de la metiltransferasa del ADN, por ejemplo, azacitidina o decitabina. Como se describe en el presente documento, se administra al sujeto una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con una terapia biológica, por ejemplo, un anticuerpo o terapia celular, por ejemplo, 225Ac-lintuzumab (Actimab-A; Actinium Pharmaceuticals), IPH2102 (Innate Pharma/Bristol Myers Squibb), SGN-CD33A (Seattle Genetics), o gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg; Pfizer). El SGN-CD33A es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende un dímero de pirrolobenzodiazepina unido a un anticuerpo anti-CD33. Actimab-A es un anticuerpo anti-CD33 (lintuzumab) marcado con actinio. El IPH2102 es un anticuerpo monoclonal que se dirige a los receptores tipo inmunoglobulina asesina (KIR). En algunas realizaciones, se administra al sujeto una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un inhibidor de FLT3, por ejemplo, sorafenib (Bayer), midostaurin (Novartis), quizartinib (Daiichi Sankyo), crenolanib (Arog Pharmaceuticals), PLX3397 (Daiichi Sankyo), AKN-028 (Akinion Pharmaceuticals) o ASP2215 (Astellas). Como se describe en el presente documento, se administra al sujeto una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un inhibidor de la isocitrato deshidrogenasa (IDH), por ejemplo, AG-221 (Celgene/Agios) o AG-120 (Agios/Celgene). Como se describe en el presente documento, al sujeto se le administra una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un regulador del ciclo celular, por ejemplo, un inhibidor de la polo-cómo-quinasa 1 (P1k1), por ejemplo, volasertib (Boehringer Ingelheim); o un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 9 (Cdk9), por ejemplo, alvocidib (Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis). Como se describe en el presente documento, se administra al sujeto una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un inhibidor de la red de señalización del receptor de células B, por ejemplo, un inhibidor del linfoma de células B 2 (Bcl-2), por ejemplo, venetoclax (Abbvie/Roche); o un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (Btk), por ejemplo, ibrutinib (Pharmacyclics/Johnson & Johnson Janssen Pharmaceutical). Como se describe en el presente documento, se administra al sujeto una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un inhibidor de la aminopeptidasa M1, por ejemplo, tosedostat (CTI BioPharma/Vernalis); un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), por ejemplo, pracinostat (MEI Pharma); un inhibidor de la multiquinasa, por ejemplo, rigosertib (Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio); o un agonista inverso péptido de CXCR4, por ejemplo, BL-8040 (BioLineRx).

Como se describe en el presente documento, los sujetos reciben una infusión de las composiciones celulares que expresan CAR de la presente divulgación antes del trasplante, por ejemplo, de células madre alogénicas. En una realización preferida, las células que expresan CAR expresan transitoriamente un NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR, por ejemplo, mediante la electroporación de un ARNm que codifica un NKR-CAR, por ejemplo, un KIR-CAR, por lo que la expresión del antígeno tumoral se termina antes de la infusión de las células madre del donante para evitar el fracaso del injerto.

Algunos pacientes pueden experimentar reacciones alérgicas a los compuestos de la presente divulgación y/o a otro(s) agente(s) anticanceroso(s) durante o después de la administración; por lo tanto, a menudo se administran agentes antialérgicos para minimizar el riesgo de una reacción alérgica. Entre los agentes antialérgicos adecuados se encuentran los corticosteroides, como la dexametasona (por ejemplo, Decadron®), la beclometasona (por ejemplo, Becloment®), hidrocortisona (también conocida como cortisona, succinato sódico de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona, y vendida con los nombres comerciales Ala-Cort®, fosfato de hidrocortisona, Solu-Cortef®, Hydrocort Acetate® y Lanacort®), prednisolona (vendida con los nombres comerciales Delta-Cortel®, Orapred®, PEDIAPRED® y Prelone®), prednisona (vendida con los nombres comerciales Deltasone®, Liquid Red®, Meticorten® y Orasone®), metilprednisolona (también conocida como 6-metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona, vendida con los nombres comerciales Duralone®, Medralone®, Medrol®, M-Prednisol® y Solu-Medrol®); antihistamínicos, como la difenhidramina (e.g., Benadryl®), hidroxizina y ciproheptadina; y broncodilatadores, como los agonistas de los receptores beta-adrenérgicos, albuterol (por ejemplo, Proventil®) y terbutalina (Brethine®).

Algunos pacientes pueden experimentar náuseas durante y después de la administración del compuesto de la presente divulgación y/o de otro(s) agente(s) anticanceroso(s); por lo tanto, se utilizan antieméticos para prevenir las náuseas (parte superior del estómago) y los vómitos. Entre los antieméticos adecuados se encuentran el aprepitant (Emend®), el ondansetrón (Zofran®), el HCl de granisetron (Kytril®), el lorazepam (Ativan®), la dexametasona (Decadron®), la proclorperazina (Compazine®), el casopitant (Rezonic® y Zunrisa®) y sus combinaciones.

A menudo se prescriben medicamentos para aliviar el dolor que se experimenta durante el periodo de tratamiento para que el paciente esté más cómodo. A menudo se utilizan analgésicos comunes de venta libre, como Tylenol®. Sin embargo, los fármacos analgésicos opiáceos como la hidrocodona/paracetamol o la hidrocodona/acetaminofén (por ejemplo, Vicodin®), la morfina (por ejemplo, Astramorph® o Avinza®), la oxycodona (por ejemplo, OxyContin® o Percocet®), el clorhidrato de oximorfona (Opana®) y el fentanilo (por ejemplo, Duragesic®) también son útiles para el dolor moderado o intenso.

En un esfuerzo por proteger las células normales de la toxicidad del tratamiento y limitar las toxicidades de los órganos, se pueden utilizar agentes citoprotectores (como neuroprotectores, eliminadores de radicales libres, cardioprotectores, neutralizadores de la extravasación de antraciclinas, nutrientes y similares) como terapia adjunta. Entre los agentes citoprotectores adecuados se encuentran la amifostina (Ethyol®), la glutamina, la dimesna (Tavocept®), la mesna (Mesnex®), el dexrazoxano (Zinecard® o Totect®), el xaliproden (Xaprixa®) y la leucovorina (también conocida como leucovorina cálcica, factor citovororum y ácido folínico).

La estructura de los compuestos activos identificados por números de código, nombres genéricos o comerciales puede tomarse de la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o de bases de datos, por ejemplo, Patents International (por ejemplo, IMS World Publications).

Los compuestos mencionados anteriormente, que pueden utilizarse en combinación con un compuesto de la presente divulgación, pueden prepararse y administrarse como se describe en la técnica, como en los documentos citados anteriormente.

Como se describe en el presente documento, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un compuesto de la presente divulgación) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para su administración a un sujeto humano o animal, ya sea solo o junto con otros agentes anticancerígenos.

Como se describe en el presente documento, la presente divulgación proporciona procedimientos para tratar a sujetos humanos o animales que sufren de una enfermedad proliferativa celular, como el cáncer. La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar a un sujeto humano o animal que necesita dicho tratamiento, comprendiendo la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, un compuesto de la presente divulgación) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, ya sea solo o en combinación con otros agentes anticancerígenos.

En particular, las composiciones se formularán juntas como una combinación terapéutica o se administrarán por separado.

En la terapia de combinación, el compuesto de la presente divulgación y otro(s) agente(s) anticanceroso(s) pueden ser administrados simultáneamente, concurrentemente o secuencialmente sin límites de tiempo específicos, donde tal administración proporciona niveles terapéuticamente efectivos de los dos compuestos en el cuerpo del paciente.

Como se describe en el presente documento, el compuesto de la presente divulgación y el otro o los otros agentes anticancerígenos se administran generalmente de forma secuencial en cualquier orden por infusión u oralmente. La pauta de dosificación puede variar en función del estadio de la enfermedad, el estado físico del paciente, los perfiles de seguridad de cada uno de los fármacos y la tolerancia a los mismos, así como de otros criterios bien conocidos por el médico que le atiende y el profesional o los profesionales que le administran la combinación. El compuesto de la presente divulgación y otro(s) agente(s) anticanceroso(s) pueden administrarse con minutos de diferencia, horas, días o incluso semanas, dependiendo del ciclo particular que se utilice para el tratamiento. Además, el ciclo podría incluir la administración de un fármaco con más frecuencia que el otro durante el ciclo de tratamiento y a diferentes dosis por administración del fármaco.

En la presente divulgación, se proporcionan kits que incluyen uno o más compuestos de la presente divulgación y un compañero de combinación como se divulga en el presente documento. Los kits representativos incluyen (a) un compuesto de la presente divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, (b) al menos un compañero de combinación, por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, por lo que dicho kit puede comprender un prospecto u otro etiquetado que incluya instrucciones de administración.

Un compuesto de la presente divulgación también puede utilizarse ventajosamente en combinación con procesos terapéuticos conocidos, por ejemplo, la administración de hormonas o especialmente de radiación. Un compuesto de la presente divulgación puede utilizarse en particular como radiosensibilizador, especialmente para el tratamiento de tumores que presentan una escasa sensibilidad a la radioterapia.

Como se describe en el presente documento, se puede administrar al sujeto un agente que reduce o mejora un efecto secundario asociado a la administración de una célula que expresa CAR. Los efectos secundarios asociados a la administración de una célula que exprese CAR incluyen, pero no se limitan a la CRS, y la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), también denominada síndrome de activación de macrófagos (MAS). Los síntomas del CRS incluyen fiebres altas, náuseas, hipotensión transitoria, hipoxia, etc. El CRS puede incluir signos y síntomas clínicos constitucionales como fiebre, fatiga, anorexia, mialgias, artralgias, náuseas, vómitos y dolor de cabeza. El CRS puede

incluir signos y síntomas clínicos en la piel, como la erupción. El CRS puede incluir signos y síntomas gastrointestinales clínicos como náuseas, vómitos y diarrea. El CRS puede incluir signos y síntomas respiratorios clínicos como taquipnea e hipoxemia. El CRS puede incluir signos y síntomas clínicos cardiovasculares como taquicardia, aumento de la presión del pulso, hipotensión, aumento del gasto cardíaco (temprano) y potencialmente disminución del gasto cardíaco (tardío). El CRS puede incluir signos y síntomas clínicos de coagulación, como elevación del dímero d, hipofibrinogenemia con o sin hemorragia. El CRS puede incluir signos y síntomas renales clínicos como la azotemia. El CRS puede incluir signos y síntomas clínicos hepáticos como la transaminitis y la hiperbilirrubinemia. El CRS puede incluir signos y síntomas neurológicos clínicos como cefalea, cambios en el estado mental, confusión, delirio, dificultad para encontrar palabras o afasia franca, alucinaciones, tremor, timetría, alteración de la marcha y convulsiones.

En consecuencia, los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento a un sujeto y la administración adicional de uno o más agentes para gestionar los niveles elevados de un factor soluble resultante del tratamiento con una célula que expresa CAR. Como se describe en el presente documento, el factor soluble elevado en el sujeto es uno o más de IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-6. Como se describe en el presente documento, el factor elevado en el sujeto es uno o más de los siguientes: IL-1, GM-CSF, IL-10, IL-8, IL-5 y fraktalina. Por lo tanto, un agente administrado para tratar este efecto secundario puede ser un agente que neutralice uno o más de estos factores solubles. Como se describe en el presente documento, el agente que neutraliza una o más de estas formas solubles es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a un esteroide (por ejemplo, corticosteroide), un inhibidor de TNF α , y un inhibidor de IL-6. Un ejemplo de inhibidor del TNF α es una molécula de anticuerpo anti-TNF α como, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol y golimumab. Otro ejemplo de inhibidor del TNF α es una proteína de fusión como el entanercept. Los inhibidores de moléculas pequeñas del TNF α incluyen, entre otros, los derivados de la xantina (por ejemplo, la pentoxifilina) y el bupropión. Un ejemplo de inhibidor de la IL-6 es una molécula de anticuerpo anti-IL-6 como tocilizumab (toc), sarilumab, elsilimomab, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301 y FM101. Como se describe en el presente documento, la molécula de anticuerpo anti-IL-6 es tocilizumab. Un ejemplo de inhibidor basado en la IL-1R es la anakinra.

Como se describe en el presente documento, al sujeto se le administra un corticosteroide, como, por ejemplo, metilprednisolona, hidrocortisona, entre otros.

Como se describe en el presente documento, se administra al sujeto un vasopresor, como, por ejemplo, norepinefrina, dopamina, fenilefrina, epinefrina, vasopresina o una combinación de los mismos.

Como se describe en el presente documento, se puede administrar al sujeto un agente antipirético. Como se describe en el presente documento, se puede administrar al sujeto un agente analgésico.

Como se describe en el presente documento, se puede administrar al sujeto un agente que potencie la actividad de una célula que exprese CAR. Por ejemplo, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora, por ejemplo, el agente es un inhibidor del punto de control. Las moléculas inhibidoras, por ejemplo, la Muerte Programada 1 (PD1), pueden disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR para montar una respuesta inmune efector. Algunos ejemplos de moléculas inhibidoras son PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo, mediante la inhibición a nivel de ADN, ARN o proteínas, puede optimizar el rendimiento de una célula que exprese CAR. En las realizaciones, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un ARNbc, por ejemplo, un ARNip o ARNhc, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas con regularidad (CRISPR), nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN), o una endonucleasa de dedo de zinc (ZFN), por ejemplo, como se describe en el presente documento, pueden utilizarse para inhibir la expresión de una molécula inhibidora en la célula que expresa el CAR. Como se describe en el presente documento, el inhibidor es un ARNhc. Como se describe en el presente documento, la molécula inhibidora se inhibe dentro de una célula que expresa CAR. Como se describe en el presente documento, una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula inhibidora está unida al ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR.

Como se describe en el presente documento, una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T está operablemente unida a un promotor, por ejemplo, un promotor derivado de H1 o U6, de manera que la molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T se expresa, por ejemplo, se expresa dentro de una célula que expresa CAR. Véase, por ejemplo Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing ARNip", capítulo 3, en Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds. Friedmann y Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007 Brummelkamp TR, et al. (2002) Ciencia 296: 550-553 Miyagishi M, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 19: 497-500. Como se describe en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T está presente en el mismo vector, por ejemplo, un vector lentiviral, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR. Como se describe en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T se sitúa en el vector, por ejemplo, el vector lentiviral, 5'- o 3'- al ácido

nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR. La molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T puede transcribirse en la misma o diferente dirección que el ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR.

- 5 Como se describe en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T está presente en un vector distinto del vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR. Como se describe en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe,
- 10 la función de las células T se expresa transitoriamente dentro de una célula que expresa CAR. Como se describe en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T se integra de forma estable en el genoma de una célula que expresa CAR. Las Figuras 44A-44E muestran ejemplos de vectores para expresar un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR con una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de
- 15 la molécula que modula o regula, por ejemplo, la función de las células T.

A continuación se proporcionan ejemplos de moléculas de ARNbc útiles para inhibir la expresión de una molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T, donde la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T es PD-1.

- 20 En la Tabla 7 se presentan los nombres de los agentes de ARNi de PDCD1 (PD1) (derivados de su posición en la secuencia del gen PDCD1 de ratón NM_008798.2), junto con las SEQ ID NOs: 216-263 representando la secuencia de ADN. Tanto las secuencias en sentido (S) como en antisentido (AS) se presentan como secuencias de 19mer y 21mer en esta tabla. También hay que tener en cuenta que la posición (PoS, por ejemplo, 176) se deriva del número de posición en la secuencia del gen PDCD1 del ratón NM_008798.2. Las SEQ ID NOs se indican en grupos de 12 que se corresponden con los "sense 19" SEQ ID NOs: 65-76; "en sentido 21" SEQ ID NOs: 77-88; "asentido 21" SEQ ID
- 25 NOs: 89-100; "asentido 19" SEQ ID NOs: 101-112.

Tabla 7. Secuencias de ARNhc de PDCD1 (PD1) de ratón

Posición en NM_008798.2	Región diana	En sentido19	En sentido21	Asentido21	Asentido19
176	CDS	GGAGGTCCCTC ACCTTCTA (SEQ ID NO: 65)	CTGGAGGTCCC TCACCTTCTA (SEQ ID NO: 77)	TAGAAAGTGAG GGACCTCCAG (SEQ ID NO: 89)	TAGAAAGTGAG GGACCTCC (SEQ ID NO: 101)
260	CDS	CGGAGGATCTT ATGCTGAA (SEQ ID NO: 66)	GTCGGAGGATC TTATGCTGAA (SEQ ID NO: 78)	TTCAGCATAAG ATCCTCCGAC (SEQ ID NO: 90)	TTCAGCATAAG ATCCTCCG (SEQ ID NO: 102)
359	CDS	CCCGCTTCCAG ATCATA (SEQ ID NO: 67)	TGCCCGCTTCC AGATCATA (SEQ ID NO: 79)	TGTATGATCTG GAAGCGGCA (SEQ ID NO: 91)	TGTATGATCTG GAAGCGGG (SEQ ID NO: 103)
528	CDS	GGAGACCTCAA CAAGATAT (SEQ ID NO: 68)	CTGGAGACCTC AACAAAGATAT (SEQ ID NO: 80)	ATATCTTGTGA GGTCTCCAG (SEQ ID NO: 92)	ATATCTTGTG AGGTCTCC (SEQ ID NO: 104)
581	CDS	AAGGCATGGTC ATGGTAT (SEQ ID NO: 69)	TCAAGGCATGG TCATTGGTAT (SEQ ID NO: 81)	ATACCAAATGAC CATGCCCTTGA (SEQ ID NO: 93)	ATACCAAATGAC CATGCCCTT (SEQ ID NO: 105)
584	CDS	GCATGGTCATT GGTATCAT (SEQ ID NO: 70)	AGGCATGGTCA TTGGTATCAT (SEQ ID NO: 82)	ATGATACCAAT GACCATGCCT (SEQ ID NO: 94)	ATGATACCAAT GACCATGC (SEQ ID NO: 106)
588	CDS	GGTCATTGGTA TCATGAGT (SEQ ID NO: 71)	ATGGTCATTGG TATCATGAGT (SEQ ID NO: 83)	ATGGTCATTGG TATCATGAGT (SEQ ID NO: 95)	ATGGTCATTGG TATCATGA (SEQ ID NO: 107)
609	CDS	CCTAGTGGGTA TCCCTGTA (SEQ ID NO: 72)	GCCCTAGTGGG TATCCCTGTA (SEQ ID NO: 84)	GCCCTAGTGGG TATCCCTGTA (SEQ ID NO: 96)	GCCCTAGTGGG TATCCCTG (SEQ ID NO: 108)

(continuación)

Posición en NM_008798.2	Región diana	En sentido 19	En sentido 21	Asentido 21	Asentido 19
919	CDS	GAGGATGGACA TTGTTCTT (SEQ ID NO: 73)	ATGAGGATGGA CATTGTTCTT (SEQ ID NO: 85)	ATGAGGATGGA CATTGTTCTT (SEQ ID NO: 97)	ATGAGGATGGA CATTGTTCTT (SEQ ID NO: 109)
1021	3'UTR	GCAATGCAGGCT ACAGTTCA (SEQ ID NO: 74)	GAGCATGCAGG CTACAGTTCA (SEQ ID NO: 86)	GAGCATGCAGG CTACAGTTCA (SEQ ID NO: 98)	GAGCATGCAGG CTACAGTT (SEQ ID NO: 110)
1097	3'UTR	CCAGCACATGC ACTGTTGA (SEQ ID NO: 75)	TTCCAGCACAT GCACTGTTGA (SEQ ID NO: 87)	TTCCAGCACAT GCACTGTTGA (SEQ ID NO: 99)	TTCCAGCACAT GCACTGTT (SEQ ID NO: 111)
1101	3'UTR	CACATGCACTG TTGAGTGA (SEQ ID NO: 76)	AGCACATGCAC TGTTGAGTGA (SEQ ID NO: 88)	AGCACATGCAC TGTTGAGTGA (SEQ ID NO: 100)	AGCACATGCAC TGTTGAGT (SEQ ID NO: 112)

5 En la Tabla 8 se presentan los nombres de los agentes de ARNi de PDCD1 (PD1) (derivados de su posición en la secuencia del gen PDCD1 humano, junto con las SEQ ID NOs. 264-311 representando la secuencia de ADN. Tanto las secuencias en sentido (S) como en antisentido (AS) se presentan como secuencias de 19 y 21 polímeros. Las SEQ ID NOs se indican en grupos de 12 que se corresponden con los "sense 19" SEQ ID NOs: 113-124; "en sentido 21" SEQ ID NOs: 125-136; "asentido 21" SEQ ID NOs: 137-148; "asentido 19" SEQ ID NOs: 149-160.

Tabla 8. Secuencias de ARNhc de PDCD1 (PD1) humano

Posición en NM_005018.2	Región diana	En sentido 19	Asentido 19	En sentido21	Asentido21
145	CDS	GGCCAGGATGG TTCTTAGA (SEQ ID NO: 113)	TCTAAGAACCA TCCTGGCC (SEQ ID NO: 125)	GCGGCCAGGAT GGTTCTTAGA (SEQ ID NO: 137)	TCTAAGAACCA TCCTGGCCGC (SEQ ID NO: 149)
271	CDS	GCTTCGTGCTA AACTGGTA (SEQ ID NO: 114)	TACCAGTTIAG CACGAAGC (SEQ ID NO: 126)	GAGCTTCGTGC TAAACTGGTA (SEQ ID NO: 138)	TACCAGTTIAG CACGAAGCTC (SEQ ID NO: 150)
393	CDS	GGGCGTGACTT CCACATGA (SEQ ID NO: 115)	TCATGTGGAAG TCACGCC (SEQ ID NO: 127)	ACGGGCGTGAC TTCACATGA (SEQ ID NO: 139)	TCATGTGGAAG TCACGCCCGT (SEQ ID NO: 151)
1497	3'UTR	CAGGCTAGAG AAGTTTCA (SEQ ID NO: 116)	TGAAACTTCTC TAGGCCCTG (SEQ ID NO: 128)	TGCAGGCCCTAG AGAAGTTTCA (SEQ ID NO: 140)	TGAAACTTCTC TAGGCCCTGCA (SEQ ID NO: 152)
1863	3'UTR	CTTGGAAACCCA TTCCTGAA (SEQ ID NO: 117)	TTCAGGAATGG GTTCCAAG (SEQ ID NO: 129)	TCCTTGGAAACC CATTCTGAA (SEQ ID NO: 141)	TTCAGGAATGG GTTCCAAGGA (SEQ ID NO: 153)
1866	3'UTR	GGAAACCCATTC CTGAAATT (SEQ ID NO: 118)	AATTCAGGAA TGGGTTC (SEQ ID NO: 130)	TTGGAACCCAT TCCTGAAATT (SEQ ID NO: 142)	AATTCAGGAA TGGGTTC (SEQ ID NO: 154)
1867	3'UTR	GAACCCATTC TGAAATTA (SEQ ID NO: 119)	TAATTCAGGA ATGGGTTC (SEQ ID NO: 131)	TGGAACCCATT CCTGAAATTA (SEQ ID NO: 143)	TAATTCAGGA ATGGGTTC (SEQ ID NO: 155)
1868	3'UTR	AACCCATTCCT GAAATTAT (SEQ ID NO: 120)	ATAATTCAGG AATGGGT (SEQ ID NO: 132)	GGAACCCATT CTGAAATTAT (SEQ ID NO: 144)	ATAATTCAGG AATGGGTTC (SEQ ID NO: 156)

(continuación)

Posición en NM_005018.2	Región diana	En sentido 19	Asentido19	En sentido21	Asentido21
1869	3'UTR	ACCCATTCCTG AAATTATT (SEQ ID NO: 121)	AATAATTTTCAG GAATGGGT (SEQ ID NO: 133)	GAACCCATTCC TGAAATTATT (SEQ ID NO: 145)	AATAATTTTCAG GAATGGGTTC (SEQ ID NO: 157)
1870	3'UTR	CCCATTCCTGA AATTATTT (SEQ ID NO: 122)	AAATAATTTCA GGAATGGG (SEQ ID NO: 134)	AACCCATTCCCT GAAATTAATT (SEQ ID NO: 146)	AAATAATTTCA GGAATGGGT (SEQ ID NO: 158)
2079	3'UTR	CTGTGGTTCTAT TATATTA (SEQ ID NO: 123)	TAATATAATAG AACCACAG (SEQ ID NO: 135)	CCCTGTGGTTCT ATTATATTA (SEQ ID NO: 147)	TAATATAATAG AACCACAGGG (SEQ ID NO: 159)
2109	3'UTR	AAATATGAGAG CATGCTAA (SEQ ID NO: 124)	TTAGCATGCTC TCATATTT (SEQ ID NO: 136)	TTAAATATGAG AGCATGCTAA (SEQ ID NO: 148)	TTAGCATGCTC TCATATTTAA (SEQ ID NO: 160)

Como se describe en el presente documento, el inhibidor de una señal inhibidora puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a una molécula inhibidora. Por ejemplo, el agente puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a PD1, PD-L1, PD-L2 o CTLA4 (por ejemplo, ipilimumab (también denominado MDX-010 y MDX-101, y comercializado como Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; Tremelimumab (anticuerpo monoclonal IgG2 disponible en Pfizer, antes conocido como ticilimumab, CP-675.206). Como se describe en el presente documento, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a TIM3. Como se describe en el presente documento, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a LAG3. Como se describe en el presente documento, el agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR, por ejemplo, el inhibidor de una molécula inhibidora, se administra en combinación con un CAR alogénico, por ejemplo, un CAR alogénico descrito en el presente documento (por ejemplo, descrito en la sección CAR alogénico del presente documento).

PD-1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. La PD-1 se expresa en las células B activadas, las células T y las células mieloides (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Se ha demostrado que dos ligandos de PD-1, PD-L1 y PD-L2, regulan a la baja la activación de las células T al unirse a PD-1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8 Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 es abundante en los cánceres humanos (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7 Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314 Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). La supresión inmunitaria puede revertirse inhibiendo la interacción local de PD-1 con PD-L1.

Los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de PD-1, PD-L1 y PD-L2 están disponibles en la técnica y pueden utilizarse en combinación con un CAR de la presente divulgación descritos en el presente documento. Por ejemplo, el nivolumab (también denominado BMS-936558 o MDX1106; Bristol-Myers Squibb) es un anticuerpo monoclonal IgG4 totalmente humano que bloquea específicamente el PD-1. El nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD-1 se divulgan en US 8.008.449 y WO2006/121168. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado que se une a PD-1. El pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales humanizados anti-PD-1 se divulgan en WO2009/101611. El pembrolizumab (antes conocido como lambrolizumab, y también denominado MK03475; Merck) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une al PD-1. El pembrolizumab y otros anticuerpos anti-PD-1 humanizados se divulgan en US 8,354,509 y WO2009/114335. MEDI4736 (Medimmune) es un anticuerpo monoclonal humano que se une a PDL1, e inhibe la interacción del ligando con PD1. MDPL3280A (Genentech / Roche) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano optimizado para Fc que se une a PD-L1. El MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos contra el PD-L1 se divulgan en Patente de los Estados Unidos No: 7,943,743 y Publicación de EE.UU. No: 20120039906. Otros agentes de unión anti-PD-L1 incluyen el YW243.55.S70 (las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se muestran en las SEQ ID NOs 20 y 21 en WO2010/077634) y MDX-1 105 (también denominado BMS-936559, y, por ejemplo, agentes de unión a anti-PD-L1 divulgados en WO2007/005874). AMP-224 (B7-DC1g; Amplimmune; por ejemplo, divulgado en WO2010/027827 y WO2011/066342), es un receptor soluble de fusión Fc de PD-L2 que bloquea la interacción entre PD-1 y B7-H1. Otros anticuerpos anti-PD-1 incluyen el AMP 514 (Amplimmune), entre otros, por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-1 divulgados en US 8.609.089, US 2010028330y/o US 20120114649.

Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo es una molécula de anticuerpo anti-PD-1 como se describe en US 2015/0210769 titulado "Moléculas de anticuerpos contra PD-1 y usos de las mismas". Como se describe en el presente documento, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR (o colectivamente todas las CDR) de una región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido de cualquiera de BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum10, BAP049-hum11, BAP049-hum12, BAP049-hum13, BAP049-hum14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clon-A, BAP049-Clon-B, BAP049-Clon-C, BAP049-Clon-D, o BAP049-Clon-E; o como se describe en la Tabla 1 de US 2015/0210769 o codificada por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas; o CDRs estrechamente relacionados, por ejemplo, CDRs que son idénticos o que tienen al menos una alteración de aminoácidos, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones o inserciones, por ejemplo, sustituciones conservadoras).

Como se describe en el presente documento, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo un anticuerpo elegido entre cualquiera de BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum10, BAP049-hum11, BAP049-hum12, BAP049-hum13, BAP049-hum14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clon-A, BAP049-Clon-B, BAP049-Clon-C, BAP049-Clon-D o BAP049-Clon-E; o como se describe en la Tabla 1 de US 2015/0210769o codificada por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas.

TIM3 (inmunoglobulina-3 de células T) también regula negativamente la función de las células T, en particular en las células CD4+ T helper 1 secretoras de IFN y las células CD8+ T citotóxicas 1, y desempeña un papel fundamental en el agotamiento de las células T. La inhibición de la interacción entre TIM3 y sus ligandos, por ejemplo, galectina-9 (Gal9), fosfotidilserina (PS) y HMGB1, puede aumentar la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos, fragmentos de

anticuerpos y otros inhibidores de TIM3 y sus ligandos están disponibles en la técnica y pueden utilizarse en combinación con un CAR CD19 descrito en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos, las moléculas pequeñas o los inhibidores peptídicos dirigidos a TIM3 se unen al dominio IgV de TIM3 para inhibir la interacción con sus ligandos. Los anticuerpos y péptidos que inhiben TIM3 se divulgan en WO2013/006490 y en US20100247521. Otros anticuerpos anti-TIM3 incluyen versiones humanizadas de RMT3-23 (divulgadas en Ngiow et al., 2011, Cancer Res, 71:3540-3551), y el clon 8B.2C12 (divulgado en Monney et al., 2002, Nature, 415:536-541). Los anticuerpos biespecíficos que inhiben TIM3 y PD-1 se divulgan en US20130156774.

Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-TIM3 o fragmento del mismo es una molécula de anticuerpo anti-TIM3 como se describe en US 2015/0218274 titulado "Moléculas de anticuerpos contra TIM3 y usos de las mismas". Como se describe en el presente documento, la molécula de anticuerpo anti-TIM3 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs (o colectivamente todas las CDRs) de una región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido de cualquiera de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las Tablas 1-4 de US 2015/0218274; o codificada por la secuencia de nucleótidos de las Tablas 1-4; o una secuencia sustancialmente idéntica (*por ejemplo*, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas, o CDRs estrechamente relacionados, *por ejemplo*, CDRs que son idénticas o que tienen al menos una alteración de aminoácidos, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (*por ejemplo*, sustituciones, deleciones o inserciones, *por ejemplo*, sustituciones conservadoras).

Como se describe en el presente documento, la molécula de anticuerpo anti TIM3 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo descrito en el presente documento, *por ejemplo* un anticuerpo elegido entre cualquiera de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las Tablas 1-4 de US 2015/0218274; o codificada por la secuencia de nucleótidos de las Tablas 1-4; o una secuencia sustancialmente idéntica (*por ejemplo*, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas

Como se describe en el presente documento, el agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR es un inhibidor de CEACAM (*por ejemplo*, inhibidor de CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5). Como se describe en el presente documento, el inhibidor de CEACAM es una molécula de anticuerpo anti-CEACAM. Algunos ejemplos de anticuerpos anti-CEACAM-1 se describen en WO 2010/125571, WO 2013/082366 WO 2014/059251 y WO 2014/022332, *por ejemplo*, un anticuerpo monoclonal 34B1, 26H7 y 5F4; o una forma recombinante del mismo, como se describe en, *por ejemplo*, US 2004/0047858, US 7.132.255 y WO 99/052552. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CEACAM se une a CEACAM-5 como se describe, *por ejemplo*, en Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529 (DOI:10.1371/journal.pone.0021146), o reacciona de forma cruzada con CEACAM-1 y CEACAM-5 como se describe en, *por ejemplo*, WO 2013/054331 y US 2014/0271618.

Sin querer estar limitado por la teoría, se cree que las moléculas de adhesión celular al antígeno carcinoembrionario (CEACAM), como CEACAM-1 y CEACAM-5, median, al menos en parte, la inhibición de una respuesta inmunitaria antitumoral (*véase, por ejemplo* Markel et al. J Immunol. 2002 Mar 15;168(6):2803-10 Markel et al. J Immunol. 2006 Nov 1;177(9):6062-71; Markel et al. Inmunología. 2009 Feb; 126(2): 186-200 Markel et al. Cancer Immunol Immunother. 2010 Feb;59(2):215-30; Ortenberg et al. Mol Cancer Ther. 2012 Jun;11(6): 1300-10 Stern et al. J Immunol. 2005 Jun 1;174(11):6692-701 Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529). *Por ejemplo*, se ha descrito que CEACAM-1 es un ligando heterofílico para TIM-3 y que desempeña un papel en la tolerancia y el agotamiento de las células T mediado por TIM-3 (*véase, por ejemplo*, WO 2014/022332 Huang, et al. (2014) Nature doi:10.1038/nature13848). Como se describe en el presente documento, se ha demostrado que el bloqueo conjunto de CEACAM-1 y TIM-3 mejora una respuesta inmunitaria antitumoral en modelos de cáncer colorrectal de xenoinjerto (*véase, por ejemplo*, WO 2014/022332; Huang, et al. (2014), *supra*). Como se describe en el presente documento, el bloqueo conjunto de CEACAM-1 y PD-1 reduce la tolerancia de las células T como se describe, *por ejemplo*, en WO 2014/059251. Por lo tanto, los inhibidores de CEACAM pueden utilizarse con los otros inmunomoduladores descritos en el presente documento (*por ejemplo*, inhibidores anti-PD-1 y/o anti-TIM-3) para potenciar una respuesta inmunitaria contra un cáncer, *por ejemplo*, un melanoma, un cáncer de pulmón (*por ejemplo*, NSCLC), un cáncer de vejiga, un cáncer de colon un cáncer de ovario y otros cánceres como se describe en el presente documento.

LAG3 (gen de activación de linfocitos 3 o CD223) es una molécula de superficie celular expresada en las células T y B activadas que ha demostrado desempeñar un papel en el agotamiento de las células T CD8+. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de LAG3 y sus ligandos están disponibles en la técnica y pueden utilizarse en combinación con un CAR CD19 descrito en el presente documento. *Por ejemplo*, el BMS-986016 (Bristol-Myers Squib) es un anticuerpo monoclonal direccionado a LAG3. El IMP701 (Immutep) es un anticuerpo antagonista de LAG3 y el IMP731 (Immutep y GlaxoSmithKline) es un anticuerpo depletor de LAG3. Otros inhibidores de LAG3 incluyen IMP321 (Immutep), que es una proteína de fusión recombinante de una porción soluble de LAG3 e Ig que se

une a las moléculas MHC de clase II y activa las células presentadoras de antígeno (APC). Otros anticuerpos se divulgan, por ejemplo, en WO2010/019570.

Como se describe en el presente documento, el agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR puede ser, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en el que el primer dominio es una molécula inhibidora, o un fragmento de la misma, y el segundo dominio es un polipéptido que se asocia con una señal positiva, por ejemplo, un polipéptido que comprende un dominio de señalización antracelular como se describe en el presente documento. Como se describe en el presente documento, el polipéptido que se asocia con una señal positiva puede incluir un dominio coestimulador de CD28, CD27, ICOS, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular de CD28, CD27 y/o ICOS, y/o un dominio de señalización primario, por ejemplo, de CD3 zeta, por ejemplo, descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, la proteína de fusión es expresada por la misma célula que expresó el CAR. Como se describe en el presente documento, la proteína de fusión es expresada por una célula, por ejemplo, una célula T que no expresa un CAR

Como se describe en el presente documento, el agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento es miR-17-92.

Como se describe en el presente documento, el agente que potencia la actividad de un CAR descrito en el presente documento es una citoquina. Las citoquinas tienen importantes funciones relacionadas con la expansión, diferenciación, supervivencia y homeostasis de las células T. Las citoquinas que pueden administrarse al sujeto que recibe una célula que expresa CAR descrita en el presente documento incluyen: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-18 e IL-21, o una combinación de ellas. En las realizaciones preferidas, la citoquina administrada es la IL-7, la IL-15 o la IL-21, o una combinación de ellas. La citoquina puede administrarse una vez al día o más de una vez al día, por ejemplo, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. La citoquina puede administrarse durante más de un día, por ejemplo, la citoquina se administra durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. Por ejemplo, la citoquina se administra una vez al día durante 7 días.

Como se describe en el presente documento, la citoquina se administra en combinación con células T que expresan CAR. La citoquina puede administrarse simultánea o simultáneamente con las células T que expresan CAR, por ejemplo, administradas el mismo día. La citoquina puede prepararse en la misma composición farmacéutica que las células T que expresan CAR, o puede prepararse en una composición farmacéutica separada. Alternativamente, la citoquina puede administrarse poco después de la administración de las células T que expresan CAR, por ejemplo, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración de las células T que expresan CAR.

Como se describe en el presente documento, cuando la citoquina se administra en un régimen de dosificación que se produce durante más de un día, el primer día del régimen de dosificación de la citoquina puede ser el mismo día que la administración con las células T que expresan CAR, o el primer día del régimen de dosificación de la citoquina puede ser 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración de las células T que expresan CAR. Como se describe en el presente documento, el primer día se administran al sujeto las células T que expresan CAR, y el segundo día se administra una citoquina una vez al día durante los siguientes 7 días. Como se describe en el presente documento, la citoquina que se administra en combinación con las células T que expresan CAR es la IL-7, la IL-15 o la IL-21.

Como se describe en el presente documento, la citoquina se administra un período de tiempo después de la administración de las células que expresan CAR, por ejemplo, al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, o 1 año o más después de la administración de las células que expresan CAR. Como se describe en el presente documento, la citoquina se administra después de evaluar la respuesta del sujeto a las células que expresan CAR. Por ejemplo, al sujeto se le administran células que expresan CAR de acuerdo con la dosis y los regímenes descritos en el presente documento. La respuesta del sujeto a la terapia celular con expresión de CAR se evalúa a las 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 1 año o más después de la administración de las células con expresión de CAR, utilizando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, incluyendo la inhibición del crecimiento del tumor, la reducción de las células tumorales circulantes o la regresión del tumor. A los sujetos que no muestren una respuesta suficiente a la terapia celular con expresión CAR se les puede administrar una citoquina. La administración de la citoquina al sujeto que tiene una respuesta subóptima a la terapia celular que expresa CAR mejora la eficacia de las células que expresan CAR o la actividad anticancerígena. En una realización preferida, la citoquina administrada tras la administración de las células que expresan CAR es la IL-7.

Combinación con inhibidores de CD19

Los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento pueden utilizarse en combinación con un inhibidor de CD19. Como se describe en el presente documento, las células que contienen CAR descritas en el presente documento, por ejemplo, las células que contienen NKR-CAR, y el inhibidor de CD19 (por ejemplo, una o más células que expresan una molécula CAR que se une a CD19, por ejemplo, una molécula CAR que se une a CD19 descrita en el presente documento) se administran simultánea o concurrentemente, o secuencialmente.

Como se describe en el presente documento, las células que contienen CAR descritas en el presente documento y el inhibidor de CD19 se infunden en un sujeto de forma simultánea o concurrente, por ejemplo, se mezclan en el mismo

volumen de infusión. Por ejemplo, una población de células que contienen CAR y células que contienen CD19CAR se mezclan. Alternativamente, se administra una población de células que coexpresan un CAR descrito en el presente documento y un CD19CAR. Como se describe en el presente documento, la administración simultánea comprende la administración por separado de las células que contienen CAR y el inhibidor de CD19, por ejemplo, dentro de un intervalo de tiempo predeterminado (por ejemplo, dentro de los 15, 30 o 45 minutos uno del otro).

Como se describe en el presente documento, el inicio de las células que contienen CAR y el inicio del inhibidor de CD19 se encuentran dentro de un intervalo de 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18 o 24 horas, o dentro de un intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 80 o 100 días. Como se describe en el presente documento, el final de la administración de las células que contienen CAR y el final de la administración del inhibidor de CD19 se encuentran dentro de un intervalo de 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18 o 24 horas, o dentro de un intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 80 o 100 días. Como se describe en el presente documento, el solapamiento en términos de administración entre el de la administración de las células que contienen CAR (por ejemplo, infusión) y el final de la administración del inhibidor de CD19 (por ejemplo, infusión) es de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos. Como se describe en el presente documento, el inhibidor de CD19 se administra antes de las células que contienen CAR. Como se describe en el presente documento, las células que contienen CAR se administran antes del inhibidor de CD19.

Como se describe en el presente documento, las células que contienen CAR se administran mientras el inhibidor de CD19 (por ejemplo, una o más células que expresan una molécula CD19CAR) está presente (por ejemplo, células en expansión) en el sujeto. Como se describe en el presente documento, el inhibidor de CD19 (por ejemplo, una o más células que expresan una molécula CD19CAR) se administra mientras las células que contienen CAR están presentes (por ejemplo, células en expansión) en el sujeto.

Un inhibidor de CD19 incluye, pero no se limita a, una célula que expresa CD19 CAR, por ejemplo, una célula CD19 CART, o un anticuerpo anti-CD 19 (por ejemplo, un anticuerpo mono o biespecífico anti-CD 19) o un fragmento o conjugado del mismo.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con una célula CAR CD19 (por ejemplo, célula CART) (por ejemplo, CTL019, por ejemplo, como se describe en WO2012/079000).

Como se describe en el presente documento, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con una célula CAR CD19 (por ejemplo, célula CART) que incluye un dominio de unión a antígeno humanizado como se describe en WO2014/153270 (por ejemplo, la Tabla 3 del WO2014/153270).

El inhibidor de CD19 (por ejemplo, una primera célula que expresa CD19 CAR) y una segunda célula que expresa CAR pueden ser expresados por el mismo tipo de célula o por tipos diferentes. Por ejemplo, la célula que expresa un CAR CD19 es una célula T CD4+ y la célula que expresa un CAR descrito en el presente documento es una célula T CD8+, o la célula que expresa un CAR CD19 es una célula T CD8+ y la célula que expresa un CAR descrito en el presente documento es una célula T CD4+. Como se describe en el presente documento, la célula que expresa un CAR CD19 es una célula T y la célula que expresa un CAR descrito en el presente documento es una célula NK, o la célula que expresa un CAR CD19 es una célula NK y la célula que expresa un CAR descrito en el presente documento es una célula T. Como se describe en el presente documento, la célula que expresa un CAR CD19 y la célula que expresa un CAR descrito en el presente documento son ambas células NK o son ambas células T, por ejemplo, son ambas células T CD4+, o son ambas células T CD8+. Como se describe en el presente documento, una sola célula expresa el CAR CD19 y el CAR descritos en el presente documento, y esta célula es, por ejemplo, una célula NK o una célula T, como una célula T CD4+ o una célula T CD8+.

Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene leucemia mieloide aguda (LMA), por ejemplo, una LMA CD19 positiva o una LMA CD19 negativa. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene un linfoma CD19+, por ejemplo, un linfoma no Hodgkin (LNH) CD19+, un FL CD19+ o un DLBCL CD19+. Como se describe en el presente documento, el sujeto tiene un linfoma CD19+ recidivante o refractario. Como se describe en el presente documento, se administra al sujeto una quimioterapia de agotamiento linfático antes, simultáneamente o después de la administración (por ejemplo, la infusión) de células CD19 CART. En un ejemplo, la quimioterapia de agotamiento linfático se administra al sujeto antes de la administración de las células CD19 CART. Por ejemplo, la quimioterapia linfodependiente termina entre 1 y 4 días (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 días) antes de la infusión de células CD19 CART. Como se describe en el presente documento, se administran múltiples dosis de células CD19 CART, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una sola dosis comprende aproximadamente 5×10^8 células CD19 CART. Como se describe en el presente documento, se administra al sujeto una quimioterapia de agotamiento linfático antes, simultáneamente o después de la administración (por ejemplo, infusión) de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, por ejemplo, una célula que no expresa CAR CD19. Como se describe en el presente documento, se administra un CART CD19 al sujeto antes, simultáneamente o después de la administración (por ejemplo, infusión) de una célula que no expresa CAR CD 19, por ejemplo, una célula que no expresa CAR CD 19 descrita en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con una célula que expresa CD19 CAR, por ejemplo, CTL019, por ejemplo, como se describe en WO2012/079000 para el tratamiento de una enfermedad asociada a la expresión de un antígeno

tumoral descrito en el presente documento, por ejemplo, un cáncer descrito en el presente documento. Sin estar limitado por la teoría, se cree que la administración de una célula que expresa CD19 CAR en combinación con una célula que expresa CAR mejora la eficacia de una célula que expresa CAR descrito en el presente documento al dirigirse a las células cancerosas de linaje temprano, por ejemplo, a las células madre del cáncer, modulando la respuesta inmunitaria, agotando las células B reguladoras y/o mejorando el microambiente del tumor. Por ejemplo, una célula que expresa CD19 CAR se dirige a células cancerosas que expresan marcadores de linaje tempranos, por ejemplo, células madre cancerosas y células que expresan CD19, mientras que la célula que expresa CAR descrito en el presente documento se dirige a células cancerosas que expresan marcadores de linaje posteriores, por ejemplo, CD123. Este enfoque de acondicionamiento puede mejorar la eficacia de la célula que expresa el CAR descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, la célula que expresa CD19 CAR se administra antes, simultáneamente o después de la administración (por ejemplo, infusión) de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento también expresa un CAR direccionado a CD19, por ejemplo, un CAR CD19. Como se describe en el presente documento, la célula que expresa un CAR descrito en el presente documento y un CAR CD19 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer descrito en el presente documento, por ejemplo, LMA. Como se describe en el presente documento, las configuraciones de una o ambas moléculas CAR comprenden un dominio de señalización intracelular primario y un dominio de señalización coestimulador. Como se describe en el presente documento, las configuraciones de una o ambas moléculas CAR comprenden un dominio de señalización intracelular primario y dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4 o 5 o más, dominios de señalización costimuladora. Como se describe en el presente documento, la molécula CAR y el CAR CD19 pueden tener el mismo o diferente dominio de señalización intracelular primario, el mismo o diferente dominio de señalización costimulador, o el mismo número o diferente número de dominios de señalización costimuladores. Alternativamente, el CAR descrito en el presente documento y el CAR CD19 están configurados como un CAR dividido, en el que una de las moléculas CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un dominio coestimulador (por ejemplo, 4-1BB), mientras que la otra molécula CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular primaria (por ejemplo, CD3 zeta).

Como se describe en el presente documento, el CAR y el segundo CAR, por ejemplo, el CAR CD19, están en el mismo vector o están en dos vectores diferentes. Como se describe en el presente documento, cuando el CAR y el segundo CAR, por ejemplo, el CAR CD19, se encuentran en el mismo vector, las secuencias de ácido nucleico que codifican el CAR descrito en el presente documento y el segundo CAR, por ejemplo, el CAR CD19, se encuentran en el mismo marco, y están separadas por uno o más sitios de escisión de péptidos, por ejemplo, P2A.

Tal como se describe en el presente documento, la célula que expresa CAR divulgada en el presente documento se administra en combinación con un inhibidor de anticuerpos anti-CD 19. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CD 19 es un dominio de unión a antígeno humanizado como se describe en WO2014/153270 (por ejemplo, la Tabla 3 del WO2014/153270), o un conjugado del mismo. Otros anticuerpos anti-CD19 ejemplares o fragmentos o conjugados de los mismos, incluyen pero no se limitan a, blinatumomab, SAR3419 (Sanofi), MEDI-551 (MedImmune LLC), Combotox, DT2219ARL (Masonic Cancer Center), MOR-208 (también llamado XmAb-5574; MorphoSys), XmAb-5871 (Xencor), MDX-1342 (Bristol-Myers Squibb), SGN-CD19A (Seattle Genetics) y AFM11 (Affimed Therapeutics). Véase, por ejemplo Hammer. *MABs*. 4.5(2012): 571-77. Blinatumomab es un anticuerpo biespecífico compuesto por dos scFv: uno que se une a CD19 y otro a CD3. Blinatumomab dirige las células T para que ataquen a las células cancerosas. Véase, por ejemplo, Hammer et al.; identificador de ensayo clínico nº NCT00274742 y NCT01209286. MEDI-551 es un anticuerpo humanizado anti-CD19 con un Fc diseñado para mejorar la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). Véase, por ejemplo, Hammer et al.; y el identificador de ensayo clínico nº NCT01957579. Combotox es una mezcla de inmunotoxinas que se unen a CD19 y CD22. Las inmunotoxinas están formadas por fragmentos de anticuerpos scFv fusionados a una cadena A de ricina deglicosilada. Véase, por ejemplo, Hammer et al. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 31.12(2009):936-41 Schindler et al. *Br. J. Haematol.* 154.4(2011):471-6. DT2219ARL es una inmunotoxina biespecífica dirigida a CD19 y CD22, que comprende dos scFv y una toxina diftérica truncada. Véase, por ejemplo, Hammer et al.; y Clinical Trial Identifier No. NCT00889408. El SGN-CD19A es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) compuesto por un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD 19 unido a un agente citotóxico sintético, la monometil auristatina F (MMAF). Véase, por ejemplo, Hammer et al.; y Clinical Trial Identifier Nos. NCT01786096 y NCT01786135. SAR3419 es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) anti-CD19 que comprende un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD19 conjugado con un derivado de la maytansina mediante un enlazador escindible. Véase, por ejemplo Younes et al. *J. Clin. Oncol.* 30.2(2012): 2776-82 Hammer et al.; Número de identificación del ensayo clínico NCT00549185; y Blanc et al. *Clin Cancer Res.* 2011;17:6448-58. XmAb-5871 es un anticuerpo anti-CD19 humanizado, diseñado por Fc. Véase, por ejemplo, Hammer et al. MDX-1342 es un anticuerpo anti-CD19 de ingeniería Fc humana con ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, Hammer et al. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo es una molécula biespecífica anti-CD19 y anti-CD3. Por ejemplo, el AFM11 es un anticuerpo biespecífico que se dirige a CD19 y CD3. Véase, por ejemplo, Hammer et al.; y el identificador de ensayo clínico nº NCT02106091. Como se describe en el presente documento, un anticuerpo anti-CD19 se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, una vacuna peptídica (como la descrita en Izumoto et al. 2008 *J Neurosurg* 108:963-971), agente inmunosupresor o agente inmunoblástico, por ejemplo, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato,

FK506, CAMPATH, anticuerpo anti-CD3, citoxina, fludarabina, rapamicina, ácido micofenólico, esteroide, FR901228 o citoquina.

Combinación con una dosis baja de un inhibidor de mTOR

5 Los procedimientos descritos en el presente documento utilizan dosis bajas, que mejoran la inmunidad, de inhibidores de mTOR, por ejemplo, inhibidores alostéricos de mTOR, incluyendo rapálogos como RAD001. La administración de una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejore la inmunidad (por ejemplo, una dosis insuficiente para suprimir completamente el sistema inmunitario, pero suficiente para mejorar la función inmunitaria) puede optimizar el rendimiento de las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, las células T o las células que expresan CAR, en el sujeto. Los procedimientos para medir la inhibición de mTOR, las dosis, los regímenes de tratamiento y las composiciones farmacéuticas adecuadas se describen en la Solicitud de patente de los Estados Unidos nº 10 2015/01240036.

Como se describe en el presente documento, la administración de una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejore la inmunidad puede dar lugar a uno o más de los siguientes resultados:

- 15 i) una disminución del número de células efectoras inmunitarias PD-1 positivas;
- ii) un aumento del número de células efectoras inmunitarias PD-1 negativas;
- iii) un aumento de la relación de células efectoras inmunitarias PD-1 negativas / células efectoras inmunitarias PD-1 positivas;
- iv) un aumento del número de células T ingenuas;
- 20 v) un aumento de la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD 62Lhigh, CD127 high CD27+, y BCL2, por ejemplo, en células T de memoria, por ejemplo, precursores de células T de memoria;
- vi) una disminución de la expresión de KLRG1, por ejemplo, en las células T de memoria, por ejemplo, en los precursores de células T de memoria; o
- 25 vii) un aumento del número de precursores de células T de memoria, por ejemplo, células con alguna de las siguientes características o una combinación de las mismas: aumento de CD62L, aumento de CD27+, disminución de KLRG1 y aumento de BCL2;

y en el que cualquiera de los anteriores, por ejemplo, i), ii), iii), iv), v), vi) o vii), se produce, por ejemplo, al menos transitoriamente, por ejemplo, en comparación con un sujeto no tratado.

30 Como se describe en el presente documento, la administración de una dosis baja de un inhibidor de mTOR, que mejora la inmunidad, da lugar a un aumento o a una prolongación de la proliferación de las células que expresan CAR, por ejemplo, en un cultivo o en un sujeto, por ejemplo, en comparación con las células que expresan CAR no tratadas o con un sujeto no tratado. Como se describe en el presente documento, el aumento de la proliferación se asocia a un aumento del número de células que expresan CAR. Los procedimientos para medir el aumento o la prolongación de la proliferación se describen en los ejemplos 9 y 10. Como se describe en el presente documento, la administración de una dosis baja de un inhibidor de mTOR, que mejora la inmunidad, da lugar a un aumento de la eliminación de 35 células cancerosas por parte de las células que expresan CAR, por ejemplo, en un cultivo o en un sujeto, por ejemplo, en comparación con las células que expresan CAR no tratadas o con un sujeto no tratado. Como se ha descrito en este documento, el aumento de la eliminación de las células cancerosas se asocia con una disminución del volumen del tumor. En el ejemplo 2 se describen los procedimientos para medir el aumento de la eliminación de células cancerosas.

40 Como se describe en el presente documento, las células que expresan una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento, se administran en combinación con una dosis baja y potenciadora de la inmunidad de un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor alostérico de mTOR, por ejemplo, RAD001, o un inhibidor catalítico de mTOR. Por ejemplo, la administración de la dosis baja, potenciadora de la inmunidad, del inhibidor de mTOR puede iniciarse antes de la administración de una célula que exprese CAR descrita en el presente 45 documento; completarse antes de la administración de una célula que exprese CAR descrita en el presente documento; iniciarse al mismo tiempo que la administración de una célula que exprese CAR descrita en el presente documento; solaparse con la administración de una célula que exprese CAR descrita en el presente documento; o continuar después de la administración de una célula que exprese CAR descrita en el presente documento.

50 Alternativa o adicionalmente, la administración de una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejore la inmunidad puede optimizar las células efectoras inmunitarias para que expresen una molécula CAR descrita en el presente documento. Como se describe en el presente documento, la administración de una dosis baja, que mejora la inmunidad, de un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor alostérico, por ejemplo, RAD001, o un inhibidor catalítico, se inicia o se completa antes de la recolección de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T o células NK, que se diseñarán para expresar una molécula CAR descrita en el presente documento, de un sujeto.

5 Como se describe en el presente documento, las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, las células T o las células NK, que se diseñan para expresar una molécula CAR descrita en el presente documento, por ejemplo, después de la recolección de un sujeto, o las células efectoras inmunitarias que expresan CAR, por ejemplo, las células T o las células NK, por ejemplo, antes de la administración a un sujeto, pueden cultivarse en presencia de una dosis baja, que mejora la inmunidad, de un inhibidor de mTOR.

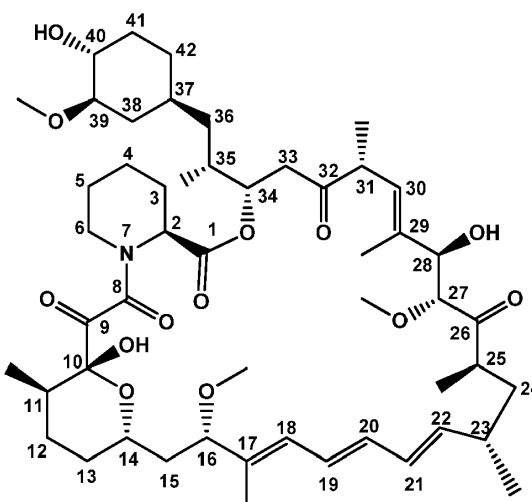
10 Como se describe en el presente documento, la administración al sujeto de una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejora el sistema inmunitario comprende la administración, por ejemplo, una vez por semana, por ejemplo, en una forma de dosificación de liberación inmediata, de 0,1 a 20, 0,5 a 10, 2,5 a 7,5, 3 a 6, o aproximadamente 5, mgs de RAD001, o una dosis bioequivalente del mismo. Como se describe en el presente documento, la administración al sujeto de una dosis baja, de refuerzo inmunitario, de un inhibidor de mTOR comprende la administración, por ejemplo, una vez por semana, por ejemplo, en una forma de dosificación de liberación sostenida, de 0,3 a 60, 1,5 a 30, 7,5 a 22,5, 9 a 18, o aproximadamente 15 mgs de RAD001, o una dosis bioequivalente de la misma.

15 Como se describe en el presente documento, una dosis de un inhibidor de mTOR se asocia con, o proporciona, una inhibición de mTOR de al menos 5 pero no más de 90 %, al menos 10 pero no más de 90 %, al menos 15, pero no más de 90 %, al menos 20 pero no más de 90 %, al menos 30 pero no más de 90 %, al menos 40 pero no más de 90 %, al menos 50 pero no más de 90 %, al menos 60 pero no más de 90 %, al menos 70 pero no más de 90 %, al menos 5 pero no más del 80 %, al menos 10 pero no más del 80 %, al menos 15 pero no más del 80 %, al menos 20 pero no más del 80 %, al menos 30 pero no más del 80 %, al menos 40 pero no más del 80 %, al menos 50 pero no más del 80 %, al menos 60 pero no más del 80 %, al menos 5 pero no más del 70 %, al menos 10 pero no más del 70 %, al menos 15 pero no más del 70 %, al menos 20 pero no más del 70 %, al menos 30 pero no más del 70 %, al menos 40 pero no más del 70 %, al menos 50 pero no más del 70 %, al menos 5 pero no más del 60 %, al menos 10 pero no más del 60 %, al menos 15 pero no más del 60 %, al menos 20 pero no más del 60 %, al menos 30 pero no más del 60 %, al menos 40 pero no más del 60 %, al menos 5 pero no más del 50 %, al menos 10 pero no más del 50 %, al menos 15 pero no más del 50 %, al menos 20 pero no más del 50 %, al menos 30 pero no más del 50 %, al menos 40 pero no más del 50 %, al menos 5 pero no más del 40 %, al menos 10 pero no más del 40 %, al menos 15 pero no más del 40 %, al menos 20 pero no más del 40 %, al menos 30 pero no más del 40 %, al menos 35 pero no más del 40 %, al menos 5 pero no más del 30 %, al menos 10 pero no más del 30 %, al menos 15 pero no más del 30 %, al menos 20 pero no más del 30 %, o al menos 25 pero no más del 30 %.

20 La extensión de la inhibición de mTOR puede ser transmitida como, o corresponde a, la extensión de la inhibición de la P70 S6 quinasa, por ejemplo, la extensión de la inhibición de mTOR puede ser determinada por el nivel de disminución de la actividad de la P70 S6 quinasa, por ejemplo, por la disminución de la fosforilación de un sustrato de la P70 S6 quinasa. El nivel de inhibición de mTOR puede evaluarse mediante diversos procedimientos, como la medición de la actividad de la quinasa P70 S6 mediante el ensayo de Boulay, como se describe en Solicitud de Patente de EE.UU. n° 2015/01240036 o como se describe en la Patente estadounidense n° 7.727.950; midiendo el nivel de S6 fosforilada por transferencia western; o evaluando un cambio en la relación de células efectoras inmunitarias negativas de PD1 con respecto a las células efectoras inmunitarias positivas de PD1.

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

30 La rapamicina es un antibiótico macrólido conocido producido por *Streptomyces hygroscopicus* que tiene la estructura mostrada en la Fórmula A



(A)

Véase, por ejemplo McAlpine, J.B., et al., *J. Antibiotics* (1991) 44: 688 Schreiber, S.L., et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1991) 113: 7433 Patente estadounidense nº 3.929.992. Hay varios esquemas de numeración propuestos para la rapamicina. Para evitar confusiones, cuando se nombran análogos específicos de la rapamicina en el presente documento, los nombres se dan con referencia a la rapamicina utilizando el esquema de numeración de la fórmula A.

Los análogos de rapamicina útiles en la divulgación son, por ejemplo, análogos O-sustituídos en los que el grupo hidroxilo en el anillo de ciclohexilo de la rapamicina se sustituye por OR₁ en el que R₁ es hidroxialquilo, hidroxialcoxilalquilo, acilaminoalquilo o aminoalquilo; por ejemplo, RAD001, también conocido como, everolimus como se describe en US 5,665,772 y WO94/09010. Otros análogos de la rapamicina adecuados son los sustituidos en la posición 26 o 28. El análogo de rapamicina puede ser un epímero de un análogo mencionado anteriormente, en particular un epímero de un análogo sustituido en la posición 40, 28 o 26, y opcionalmente puede ser hidrogenado adicionalmente, por ejemplo, como se describe en US 6,015,815, WO95/14023 y WO99/15530 por ejemplo, ABT578, también conocido como zotarolimus, o un análogo de la rapamicina descrito en US 7,091,213, WO98/02441 y WO01/14387 por ejemplo, AP23573, también conocido como ridaforolimus.

Ejemplos de análogos de rapamicina adecuados para su uso en la presente divulgación de US 5,665,772 incluyen, pero no se limitan a, 40-O-bencil-rapamicina, 40-O-(4'-hidroximetil)bencil-rapamicina, 40-O-[4'-(1,2-dihidroxi)etil]bencil-rapamicina, 40-O-alil-rapamicina, 40-O-[3'-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4(S)-il)-prop-2'-en-1'-il]-rapamicina, (2'E,4'S)-40-O-(4',5'-dihidroxipent-2'-en-1'-il)-rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etoxicarbonilmetil-rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, 40-O-(3-hidroxi)propil-rapamicina, 40-O-(6-hidroxi)hexil-rapamicina, 40-O-[2-(2-hidroxi)etoxi]etil-rapamicina, 40-O-[(3S)-2,2-dimetildioxolan-3-il]metil-rapamicina, 40-O-[(2S)-2,3-dihidroxiprop-1-il]-rapamicina, 40-O-(2-acetoxi)etil-rapamicina, 40-O-(2-nicotinoiloxi)etil-rapamicina, 40-O-[2-(N-morfolino)acetoxi]etil-rapamicina, 40-O-(2-N-imidazolilacetoxi)etil-rapamicina, 40-O-[2-(N-metil-N'-piperazinil)acetoxi]etil-rapamicina, 39-O-desmetil-39,40-O,O-etileno-rapamicina, (26R)-26-dihidro-40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, 40-O-(2-aminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-acetaminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-nicotinamidoetil)-rapamicina, 40-O-(2-(N-metil-imidazo-2'-ilcarbetoxamido)etil)-rapamicina, 40-O-(2-etoxicarbonilaminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-tolisulfonamidoetil)-rapamicina y 40-O-[2-(4',5'-dicarboetoxi-1',2',3'-triazol-1'-il)-etilo]-rapamicina.

Otros análogos de rapamicina útiles en la presente divulgación son análogos en los que el grupo hidroxilo en el anillo de ciclohexilo de la rapamicina y/o el grupo hidroxilo en la posición 28 se sustituye por un grupo hidroxiester son conocidos, por ejemplo, los análogos de rapamicina que se encuentran en US RE44,768 por ejemplo, el temsirolimus.

Otros análogos de rapamicina útiles en la presente divulgación incluyen aquellos en los que el grupo metoxi en la posición 16 se sustituye por otro sustituyente, preferentemente (opcionalmente hidroxisustituido) alquiloxi, bencilo, ortometoxibencilo o clorobencilo y/o en los que el grupo metoxi en la posición 39 se suprime junto con el carbono 39, de modo que el anillo de ciclohexilo de la rapamicina se convierte en un anillo de ciclopentilo que carece del grupo metoxi en la posición 39; por ejemplo, como se describe en WO95/16691 y WO96/41807. Los análogos pueden modificarse aún más, de manera que el hidroxilo en la posición 40 de la rapamicina se alquila y/o se reduce el 32-carbonilo.

Análogos de la rapamicina de WO95/16691 incluyen, pero no se limitan a, 16-demetoxi-16-(pent-2-quinilo)-rapamicina, 16-demetoxi-16-(pero-2-quinilo)-rapamicina, 16-demetoxi-16-(propargilo)-rapamicina, 16-demetoxi-16-(4-hidroxi-but-2-quinilo)-rapamicina, 16-demetoxi-16-benciloxi-40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, 16-demetoxi-16-benciloxi-rapamicina, 16-demetoxi-16-orto-metoxibencil-rapamicina, 16-demetoxi-40-O-(2-metoxi)etil-16-pent-2-inil]oxi-rapamicina, 39-demetoxi-40-desoxi-39-formil-42-nor-rapamicina, 39-deetoximetoxi-40-desoxi-39-hidroximetil-42-nor-rapamicina, 39-deetoximetoxi-40-desoxi-39-carboxi-42-nor-rapamicina, 39-deetoximetoxi-40-desoxi-39-(4-metil-piperazin-1-il)carbonil-42-nor-rapamicina, 39-demetoxi-40-desoxi-39-(morfolin-4-il)carbonil-42-nor-rapamicina, 39-

demetoxi-40-desoxi-39-[N-metil, N-(2-piridina-2-il-etil)]carbamoil-42-nor-rapamicina y 39-demetoxi-40-desoxi-39-(p-toluenosulfonilhidrazonometil)-42-nor-rapamicina.

5 Análogos de la rapamicina de WO96/41807 incluyen, pero no se limitan a, 32-deoxo-rapamicina, 16-O-pent-2-inil-32-deoxo-rapamicina, 16-O-pent-2-inil-32-deoxo-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina 16-O-pent-2-inil-32-(S)-dihidro-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, 32(S)-dihidro-40-O-(2-metoxi)etil-rapamicina y 32(S)-dihidro-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina.

Otro análogo de la rapamicina adecuado es el umirolimus, descrito en US2005/0101624.

10 RAD001, también conocido como everolimus (Afinitor®), tiene el nombre químico de (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-12-((1R)-2-((1S,3R,4R)-4-(2-hidroxietoxi)-3-etoximetoxiciclohexil)-1-metiletil)-19,30-dietoximetoxi-15,17,21,23,29,35 -hexametil-11,36-dioxa-4-aza-triciclo[3.0.3.1.04,9]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraeno-2,3,10,14,20-pentaona.

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

15 Alternativa o adicionalmente, se han encontrado inhibidores de mTOR catalíticos y competitivos por ATP que se dirigen directamente al dominio de la quinasa mTOR y se dirigen tanto a mTORC1 como a mTORC2. También son inhibidores más eficaces de mTORC1 que los inhibidores alostéricos de mTOR como la rapamicina, porque modulan las salidas de mTORC1 resistentes a la rapamicina, como la fosforilación de 4EBP1-T37/46 y la traducción dependiente de la tapa.

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

35 Otros ejemplos de inhibidores catalíticos de mTOR incluyen 8-(6-metoxi-piridina-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometil-fenil)-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (WO2006/122806) y Ku-0063794 (García-Martínez JM, et al., Biochem J., 2009, 421(1), 29-42.. Ku-0063794 es un inhibidor específico de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) WYE-354 es otro ejemplo de inhibidor catalítico de mTor (Yu K, et al. (2009). Actividad bioquímica, celular e *in vivo* de nuevos inhibidores selectivos y competitivos con el ATP de la diana mamífera de la rapamicina. Cancer Res. 69(15): 6232-6240).

Los inhibidores de mTOR útiles según la presente divulgación también incluyen profármacos, derivados, sales farmacéuticamente aceptables o análogos de cualquiera de los anteriores.

40 Los inhibidores de mTOR, como RAD001, pueden formularse para su administración según procedimientos bien establecidos en la técnica, basados en las dosis particulares descritas en el presente documento. En particular, La patente estadounidense 6.004.973 proporciona ejemplos de formulaciones utilizables con los inhibidores de mTOR descritos en el presente documento.

COMPOSICIONES Y TRATAMIENTOS FARMACÉUTICOS

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender una célula que expresa CAR, por ejemplo, una pluralidad de células que expresan CAR, como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluir tampones, como la solución salina neutra, la solución salina fosfatada y similares; hidratos de carbono, como la glucosa, la manosa, la sacarosa o los dextranos, el manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos, como la glicina; antioxidantes; agentes quelantes, como el EDTA o el glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente divulgación están en un aspecto formuladas para la administración intravenosa.

55 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse de forma adecuada a la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y la frecuencia de administración se determinarán en función de factores como el estado del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del mismo, aunque las dosis adecuadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

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

10 Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente efectiva", "una cantidad efectiva antitumoral", "una cantidad efectiva inhibidora de tumores" o "una cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente divulgación a administrar puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y estado del paciente (sujeto). En general, puede afirmarse que una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en el presente documento puede administrarse a una dosis de 10⁴ a 10⁹ células/kg de peso corporal, preferiblemente de 10⁵ a 10⁶ células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de células T también pueden administrarse varias veces a estas dosis. Las células pueden administrarse mediante técnicas de infusión comúnmente conocidas en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988). Un experto en medicina puede determinar fácilmente la dosis y el régimen de tratamiento óptimos para un paciente en particular, controlando al paciente en busca de signos de la enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

25 Como se describe en el presente documento, una dosis de células CAR (por ejemplo, células NKR-CAR, por ejemplo, células KIR-CAR) comprende aproximadamente 1 x 10⁶, 1,1 x 10⁶, 2 x 10⁶, 3,6 x 10⁶, 5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 1,8 x 10⁷, 2 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 2 x 10⁸ o 5 x 10⁸ células/kg. Como se describe en el presente documento, una dosis de células CAR (por ejemplo, células NKR-CAR, por ejemplo, células KIR-CAR) comprende al menos aproximadamente 1 x 10⁶, 1,1 x 10⁶, 2 x 10⁶, 3,6 x 10⁶, 5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 1,8 x 10⁷, 2 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 2 x 10⁸, o 5 x 10⁸ células/kg. Como se describe en el presente documento, una dosis de células CAR (por ejemplo, células NKR-CAR, por ejemplo, células KIR-CAR) comprende hasta aproximadamente 1 x 10⁶, 1,1 x 10⁶, 2 x 10⁶, 3,6 x 10⁶, 5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 1,8 x 10⁷, 2 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 2 x 10⁸, o 5 x 10⁸ células/kg. Como se describe en el presente documento, una dosis de células CAR (por ejemplo, células NKR-CAR, por ejemplo, células KIR-CAR) comprende aproximadamente 1,1 x 10⁶ - 1,8 x 10⁷ células/kg. Como se describe en el presente documento, una dosis de células CAR (por ejemplo, células NKR-CAR, por ejemplo, células KIR-CAR) comprende aproximadamente 1 x 10⁷ 2 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 2 x 10⁸, 5 x 10⁸, 1 x 10⁹, 2 x 10⁹ o 5 x 10⁹ células. Como se describe en el presente documento, una dosis de células CAR (por ejemplo, células NKR-CAR, por ejemplo, células KIR-CAR) comprende al menos aproximadamente 1 x 10⁷ 2 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 2 x 10⁸, 5 x 10⁸, 1 x 10⁹, 2 x 10⁹ o 5 x 10⁹ células. Como se describe en el presente documento, una dosis de células CAR (por ejemplo, células NKR-CAR, por ejemplo, células KIR-CAR) comprende hasta aproximadamente 1 x 10⁷ 2 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 2 x 10⁸, 5 x 10⁸, 1 x 10⁹, 2 x 10⁹ o 5 x 10⁹ células.

Las células pueden administrarse mediante técnicas de infusión comúnmente conocidas en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988).

40 Como se describe en el presente documento, se puede desear administrar células activadas que expresan CAR a un sujeto y posteriormente volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar las células de la misma según la presente divulgación y reinfundir al paciente con estas células activadas y expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. Como se describe en el presente documento, las células T pueden activarse a partir de extracciones de sangre de entre 10cc y 400cc. Como se describe en el presente documento, las células T se activan a partir de extracciones de sangre de 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc o 100cc. Para no quedarnos con la teoría, el uso de este protocolo de múltiples extracciones de sangre y múltiples reinfusiones puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de células T.

50 La administración de las composiciones del sujeto puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo la inhalación de aerosoles, la inyección, la ingestión, la transfusión, la implantación o el trasplante. Las composiciones en el presente documento descritas pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (*i.v.*) o intraperitoneal. Como se describe en el presente documento, las composiciones de células que expresan CAR (por ejemplo, células T o células NK) de la presente divulgación se administran a un paciente por inyección intradérmica o subcutánea. Como se describe en el presente documento, las composiciones de células que expresan CAR (por ejemplo, células T o células NK) de la presente divulgación se administran preferentemente por inyección *i.v.* Las composiciones de células que expresan CAR (por ejemplo, células T o células NK) pueden inyectarse directamente en un tumor, un ganglio linfático o un sitio de infección.

60 Como se describe en el presente documento, las células activadas y expandidas mediante los procedimientos descritos en el presente documento, u otros procedimientos conocidos en la técnica en los que las células T se expanden a niveles terapéuticos, se administran a un paciente junto con (*por ejemplo*, antes, simultáneamente o después) de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo pero no limitándose al tratamiento con agentes tales como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, tratamiento con citarabina (también

conocido como ARA-C) o natalizumab para pacientes con EM o tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. En otras realizaciones, las células T de la divulgación pueden utilizarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunosupresores como CAM PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente del calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991 Bierer et al., Curr. Opin. Inmune. 5:763-773, 1993). Como se describe en el presente documento, las composiciones celulares de la presente divulgación se administran a un paciente junto con (*por ejemplo*, antes, simultáneamente o después) un trasplante de médula ósea, una terapia ablativa de células T utilizando agentes quimioterapéuticos como, por ejemplo, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. Como se describe en el presente documento, las composiciones celulares de la presente divulgación se administran tras una terapia ablativa de células B, como los agentes que reaccionan con CD20, *por ejemplo*, Rituxan. Por ejemplo, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con altas dosis de quimioterapia seguido de un trasplante de células madre de sangre periférica. Como se describe en el presente documento, tras el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente divulgación. Como se describe en este documento, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

Como se describe en el presente documento, los sujetos pueden someterse a leucaféresis, en la que los leucocitos se recogen, se enriquecen o se agotan *ex vivo* para seleccionar y/o aislar las células de interés, por ejemplo, las células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T o células NK). Estos aislados de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T o células NK) pueden expandirse por procedimientos conocidos en la técnica y tratarse de manera que se introduzcan uno o más constructos CAR de la divulgación, creando así una célula que exprese CAR (por ejemplo, células T CAR o células NK que expresen CAR) de la divulgación. Los sujetos que lo necesiten podrán someterse posteriormente a un tratamiento estándar con altas dosis de quimioterapia seguido de un trasplante de células madre de sangre periférica. Como se describe en el presente documento, después del trasplante o simultáneamente a él, los sujetos reciben una infusión de la célula expandida que expresa CAR (por ejemplo, célula T CAR o célula NK que expresa CAR) de la presente divulgación. Como se describe en este documento, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosis de los tratamientos anteriores que se administrará a un paciente variará con la naturaleza precisa de la condición que se está tratando y el receptor del tratamiento. El escalado de las dosis para la administración en humanos puede realizarse según las prácticas aceptadas en la técnica. Se han debatido estrategias de dosificación y programación de las células T CAR (Ertl et al, 2011, Cancer Res, 71:3175-81 Junghans, 2010, Journal of Translational Medicine, 8:55).

Como se describe en el presente documento, el CAR se introduce en las células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T o células NK), por ejemplo, utilizando la transcripción *in vitro*, y el sujeto (por ejemplo, humano) recibe una administración inicial de una célula que expresa CAR (por ejemplo, La administración inicial de una célula que expresa CAR (por ejemplo, una célula T o una célula NK que expresa CAR) de la divulgación, y una o más administraciones posteriores de la célula que expresa CAR (por ejemplo, una célula T o una célula NK que expresa CAR) de la divulgación, en la que la una o más administraciones posteriores se administran menos de 15 días, por ejemplo, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 días después de la administración anterior. Como se describe en el presente documento, se administra más de una administración de la célula que expresa CAR (por ejemplo, célula T CAR o célula NK que expresa CAR) de la divulgación al sujeto (por ejemplo, humano) por semana, por ejemplo, 2, 3 o 4 administraciones de la célula que expresa CAR (por ejemplo, célula T CAR o célula NK que expresa CAR) de la divulgación por semana. Como se describe en el presente documento, el sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) recibe más de una administración de la célula que expresa CAR (por ejemplo, célula T CAR o célula NK que expresa CAR) a la semana (por ejemplo, 2, 3 o 4 administraciones a la semana) (también denominado en el presente documento como ciclo), seguido de una semana de no administración de la célula que expresa CAR (por ejemplo, célula T CAR o célula NK que expresa CAR) y, a continuación, una o más administraciones adicionales de la célula que expresa CAR (por ejemplo, célula NK que expresa CAR), (por ejemplo, células T con CAR o células NK con CAR) y, a continuación, una o más administraciones adicionales de células con CAR (por ejemplo, células T con CAR o células NK con CAR) (por ejemplo, más de una administración de células con CAR (por ejemplo, células T con CAR o células NK con CAR) por semana). Como se describe en el presente documento, el sujeto (por ejemplo, el sujeto humano) recibe más de un ciclo de células que expresan CAR (por ejemplo, células T CAR o células NK que expresan CAR), y el tiempo entre cada ciclo es inferior a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 días. Como se describe en el presente documento, las células que expresan CAR (por ejemplo, células T CAR o células NK que expresan CAR) se administran en días alternos durante 3 administraciones por semana. Como se describe en el presente documento, las células que expresan CAR (por ejemplo, células T CAR o células NK que expresan CAR) de la divulgación se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

Como se describe en el presente documento, las células CD123 que expresan CAR (por ejemplo, células T CAR o células NK que expresan CAR) se generan utilizando vectores virales lentivirales, como el lentivirus. La célula que exprese CAR (por ejemplo, célula T CAR o célula NK que exprese CAR) generada de esa manera tendrá una expresión estable de CAR.

Como se describe en el presente documento, las células que expresan CAR, por ejemplo, las CART o las células NK que expresan CAR, se generan utilizando un vector viral como un vector gammaretroviral, por ejemplo, un vector gammaretroviral descrito en el presente documento. Las células que expresan CAR, por ejemplo, las CART o las células NK que expresan CAR, generadas con estos vectores pueden tener una expresión estable de CAR.

5 Como se describe en el presente documento, la célula que expresa CAR (por ejemplo, la célula T CAR o la célula NK que expresa CAR) expresa transitoriamente vectores CAR durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días después de la transducción. La expresión transitoria de los CAR puede realizarse mediante la administración de vectores de ARN CAR. Como se describe en el presente documento, el ARN del CAR se transduce en la célula (por ejemplo, célula T o célula NK) mediante electroporación.

10 Un problema potencial que puede surgir en pacientes tratados con células CAR de expresión transitoria (por ejemplo, células T CAR o células NK que expresan CAR) (particularmente con CARs murinos con scFv) es la anafilaxia después de múltiples tratamientos.

15 Sin estar limitado por esta teoría, se cree que tal respuesta anafiláctica podría ser causada por un paciente que desarrolla una respuesta humoral anti-CAR, es decir, anticuerpos anti-CAR que tienen un isotipo anti-IgE. Se cree que las células productoras de anticuerpos de un paciente sufren un cambio de clase del isotipo IgG (que no causa anafilaxia) al isotipo IgE cuando hay una pausa de diez a catorce días en la exposición al antígeno.

Si un paciente tiene un alto riesgo de generar una respuesta de anticuerpos anti-CAR durante el curso de la terapia CAR transitoria (como las generadas por transducciones de ARN), las pausas de infusión de células que expresan CAR (por ejemplo, células T CAR o células NK que expresan CAR) no deben durar más de diez a catorce días.

20 EJEMPLOS EXPERIMENTALES

La divulgación se describe con más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se ofrecen a título meramente ilustrativo y no pretenden ser limitativos, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1: Receptores NK quiméricos

25 Los resultados presentados en el presente documento demuestran un enfoque alternativo para construir CARs para células T que pueden ser regulados más finamente en comparación con los diseños actuales de CAR. Los experimentos fueron diseñados para desarrollar un nuevo sistema CAR regulado que comprende al menos dos o tres proteínas de fusión quiméricas. La señal primaria de activación de las células T y las señales inhibitorias se basan en los receptores activadores e inhibidores naturales de las células NK, conocidos como receptores similares a las inmunoglobulinas de las células asesinas (KIR).

30 Los KIRs existen como formas activadoras e inhibitorias que dependen del dominio intracelular del receptor. Los KIRs activadores emiten sus señales a través de una interacción con la proteína de membrana que contiene un motivo de activación basado en la inmutirosina (ITAM), DAP12, que es reclutada por residuos dentro de los dominios transmembrana de estas proteínas. Los KIRs inhibitorios tienen un dominio citoplasmático que contiene motivos inhibitorios basados en la inmutitribosina (ITIMs), que anulan la señal de activación que conduce a la inhibición de la actividad citolítica y productora de citoquinas de las NK. Al igual que los TCR, los KIR pertenecen a la familia de receptores proteicos de las inmunoglobulinas, y muchos se unen a ligandos invariables del MHC y similares a MHC. Sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, se cree que estas interacciones se utilizan para distinguir de forma natural las células normales (que suelen expresar una alta densidad de CMH de clase I) de las células malignas o infectadas por virus (que suelen tener un nivel bajo o inexistente de CMH de clase I).

35 Los KIRs existen como formas activadoras e inhibitorias que dependen del dominio intracelular del receptor. Los KIRs activadores emiten sus señales a través de una interacción con la proteína de membrana que contiene un motivo de activación basado en la inmutirosina (ITAM), DAP12, que es reclutada por residuos dentro de los dominios transmembrana de estas proteínas. Los KIRs inhibitorios tienen un dominio citoplasmático que contiene motivos inhibitorios basados en la inmutitribosina (ITIMs), que anulan la señal de activación que conduce a la inhibición de la actividad citolítica y productora de citoquinas de las NK. Al igual que los TCR, los KIR pertenecen a la familia de receptores proteicos de las inmunoglobulinas, y muchos se unen a ligandos invariables del MHC y similares a MHC. Sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, se cree que estas interacciones se utilizan para distinguir de forma natural las células normales (que suelen expresar una alta densidad de CMH de clase I) de las células malignas o infectadas por virus (que suelen tener un nivel bajo o inexistente de CMH de clase I).

40 Se han construido receptores de antígenos quiméricos similares a KIR (KIR-CARs) que fusionan un scfv a un antígeno diana de interés con KIRs activadores e inhibidores como se muestra en la Figura 1. La activación condicional de las células T se genera mediante el acoplamiento de un KIR-CAR activador (actKIR-CAR) o un TCR-zeta CAR estándar con un scfv a un antígeno de la célula maligna de interés. Un CAR inhibidor (inh) que lleve un scfv dirigido contra un antígeno que esté presente en el tejido normal, pero no en el maligno, proporcionaría una amortiguación de la señal primaria del CAR activador cuando la célula T se encuentre con células normales. Entre los ejemplos de antígenos que sirven de dianas útiles para los CAR inhibidores se encuentran los receptores de efrina (Pasquale, 2010, Nat Rev Cancer 10(3): 165-80) y las claudinas (Singh et al., 2010, J Oncol, 2010:541957), que son expresadas por las células epiteliales de los tejidos normales, pero que a menudo se pierden selectivamente en los cánceres (por ejemplo, EPHA7).

Ejemplo 2: Activación de la construcción y la actividad de KIR-CAR

45 Se diseñaron experimentos para construir KIR-CARs activadores basados en la fusión del scFv anti-CD19 o anti-mesotelina (SS-1) que fueron incorporados previamente en CARs basados en el dominio citoplasmático TCR-zeta que están actualmente en ensayos clínicos. Se eligió el receptor KIR activador humano KIR2DS2 como receptor base inicial para el actKIR-CAR. Para emitir señales activadoras, los actKIR-CARs requerían la coexpresión de DAP12, que no se expresa normalmente en las células T. Por lo tanto, se construyó un vector lentiviral que expresa tanto el actKIR-CAR como el DAP12 humano utilizando un casete génico "bicistrónico" basado en el péptido de salto ribosomal 2A.

En la Figura 2 se ilustra un diagrama del vector lentiviral. Los estudios iniciales demostraron que los actKIR-CARs se expresaban eficazmente en células T humanas primarias y que el actKIR-CAR SS1 se unía a la mesotelina (Figura 3). De forma similar al SS1 scFv CD3 zeta (SS1- ζ) CAR desarrollado y publicado anteriormente (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106(9):3360-5), las células T que expresan el SS1 actKIR-CAR demostraron actividad citotóxica hacia las células K562 objetivo diseñadas para expresar el ligando de mesotelina (KT-meso), como se muestra en la Figura 4. Ninguno de los receptores muestra la muerte de K562 de tipo salvaje que carece de la diana de la mesotelina.

Dado que la actividad citotóxica del SS1 KIR CAR hacia las células diana positivas a la mesotelina fue menor que la del CAR estándar basado en el TCRzeta dirigido al mismo antígeno con una expresión superficial del CAR comparable, se cree que el CAR de mesotelina puede tener una bisagra extracelular (basada en el KIR2DS2 de tipo salvaje) que no es óptima para la segregación del CD45 debido a su longitud. Se cree que la segregación cinética de los receptores activadores basados en ITAM de CD45 es un mecanismo clave para la activación del TCR, y depende de una escala de longitud entre las membranas de las células T y de las células diana de ~14-15 nm (Choudhuri et al., 2005, Nature 436(7050):578-82). Se estima que el KIR2DS2 basado en el SS1 KIR-CAR tiene una escala de longitud de más de 20 nm basada en la estructura cristalina parcial de la mesotelina que demuestra que el epítipo SS1 está probablemente a una distancia de ~10 nm de la membrana de la célula diana (Ma et al., 2012, J Biol Chem 287(40):33123-31) y CAR que se estima en ~10 nm suponiendo que cada dominio tipo Ig es ~3.5 nm en la bisagra de KIR2DS2 además del scFv. Por lo tanto, se construyó un KIR CAR activador en el que se eliminó la bisagra de KIR2DS2 (KIRS2 CAR), como se muestra esquemáticamente en la Figura 5. Se demostró que un CAR de KIRS2 basado en SS1 scFv mostraba una mayor actividad citotóxica hacia las células diana que expresaban mesotelina en comparación con el CAR formado por la fusión del SS1 scFv en el KIR2DS2 de longitud completa (Figura 6). Este CAR KIRS2 optimizado también mostró una mayor actividad que el CAR TCRzeta basado en scFv SS1 con una bisagra extracelular CD8 alfa.

Ejemplo 3: Construcción y actividad de InhKIR-CAR

Se construyó un KIR-CAR inhibidor basado en la fusión del scFv anti-mesotelina SS1 con la base del receptor KIR2DL3 inhibidor. Los estudios iniciales demostraron que los inhKIR-CARs se expresaban eficazmente en células T humanas primarias. CD19 actKIR-CAR, SS1 actKIR-CAR y SS1 inhKIR-CAR solos o en combinación se han introducido en células T Jurkat que llevan un reportero dsGFP bajo el control de un promotor impulsado por NFAT para supervisar la activación de esta vía de señalización crítica de las células T. Mientras que las células T Jurkat que expresan CD19 actKIR-CAR o SS1 actKIR-CAR por sí solas se activan eficazmente por K562 que expresan tanto CD19 como mesotelina (KT-meso/CD19), las células T Jurkat que coexpresan CD19 actKIR-CAR y SS1 inhKIR-CAR mostraron una activación notablemente reducida por las mismas células diana KT-meso/CD19 (Figura 7A); sin embargo, el análisis de la expresión de superficie de la unión de CD19 y mesotelina scFv utilizando reactivos específicos para el idiotipo demostró sorprendentemente que la expresión de las diferentes especificidades de diana scFv eran mutuamente excluyentes (Figura 7B).

Ejemplo 4: Sensibilidad de los diseños KIR-CAR activadores a los sistemas de receptores inhibidores naturales

Dado que la coexpresión de dos scFv CARs es limitada, se siguió una estrategia para evaluar la sensibilidad de los CARs activadores basados en KIR a las señales inhibitorias derivadas del receptor PD-1. PD-1 es un receptor natural de las células T que utiliza un ITIM en el dominio citoplasmático similar a los KIR inhibidores para reclutar fosfatasa que regulan negativamente la señalización del TCR. En la Figura 19 se muestra una representación esquemática. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que la PD-1 de tipo salvaje puede ser sobreexpresada tanto con un CAR basado en KIR activador como con un CAR basado en TCR-zeta direccionado a la mesotelina (Figuras 8A y 8C). Los resultados también muestran que esta combinación condujo a la inhibición dependiente del ligando 1 de PD-1 (PDL-1) de la citotoxicidad KIR-CAR activadora específica de la mesotelina (Figura 9). En el contexto de una expresión normal de PD-1 por parte de las células T (es decir, células T sin transfección de PD-1), el KIR-CAR muestra una menor inhibición cuando se encuentra con células diana que sobreexpresan PD-L1 en comparación con el CAR basado en TCR-zeta. Sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, se cree que esto puede ser una ventaja de los KIR-CAR cuando se encuentran con tumores que comúnmente expresan ligandos de receptores inhibidores.

Ejemplo 5: Activación dependiente de la coestimulación de los KIR CARs

Se diseñaron experimentos para evaluar los efectos de los receptores coestimuladores quiméricos (CCR) en el sistema KIR-CAR en comparación con lo descrito con los CAR estándar por Kloss et al. (Kloss et al., 2013, Nat Biotechnol 31(1):71-5). También se han diseñado experimentos para evaluar los requisitos de activación dependientes de la coestimulación para los KIRs mediante la participación del receptor CD28 endógeno en la célula T utilizando el anticuerpo agonista, clon 9.3. Como se muestra en la Figura 14, el CAR KIRS2 mostró una proliferación robusta en respuesta a objetivos positivos para la mesotelina en ausencia de coestimulación de CD28. Esta proliferación es superior a la observada con un CAR TCR-zeta, donde se ha demostrado que la coestimulación es fundamental para la proliferación. Estos datos sugieren que los CAR basados en KIR pueden no tener los mismos requisitos de coestimulación que los CAR de TCR-zeta para la proliferación específica de antígenos (Milone et al., 2009, Mol Ther 17(8): 1453-64; Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106(9):3360-5), y esta independencia de la coestimulación puede ser una ventaja significativa de los CAR basados en KIR frente a los actuales CAR basados en

TCR-zeta. Se han diseñado experimentos para evaluar los CAR basados en KIR en ratones humanizados para probar los CAR basados en KIR frente a los CAR con y sin dominios coestimuladores en un entorno preclínico *in vivo* (los datos y experimentos del ejemplo 5 también se presentan en el ejemplo 6).

Ejemplo 6: Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) basados en receptores similares a inmunoglobulinas asesinas (KIR) desencadenan una robusta actividad citotóxica en los tumores sólidos

Los receptores antigénicos quiméricos (CAR) que llevan un dominio de unión a antígeno unido en *cis* a los dominios citoplásmicos de CD3- ζ y a los receptores coestimuladores proporcionan un procedimiento potente para la ingeniería de la citotoxicidad de las células T hacia los tumores (Grupp et al., *The New England journal of medicine*, 368(16):1509-18, 2013; Brentjens et al., *Science translational medicine*, 5(177):177ra38, 2013; Porter et al., *The New England journal of medicine*, 365(8):725-33, 2011). En el presente documento se describe un receptor quimérico alternativo en el que un fragmento variable de cadena única (scFv) direccionado a la mesotelina (SS1) se fusionó con el dominio transmembrana y citoplásmico de KIR2DS2, un receptor estimulante similar a la inmunoglobulina asesina (KIR) normalmente expresado por las células asesinas naturales (NK). Este CAR basado en SS1-KIR2DS2 desencadena una robusta actividad citotóxica específica de antígeno y una función efectora *in vitro*, como la secreción de citoquinas y la proliferación, cuando se introduce en células T humanas en combinación con la molécula adaptadora DAP12. Las células T modificadas para expresar un CAR KIR y DAP12 muestran una actividad antitumoral significativamente mayor en un modelo de xenoinjerto de tumor resistente en comparación con las células T transducidas con un CAR estándar basado en CD3 ζ , lo que sugiere que el CAR basado en KIR puede superar las señales inhibitorias dentro de los tumores que limitan los CAR basados en CD3 ζ de segunda y tercera generación. Los datos presentados en el presente documento apoyan la futura evaluación clínica de un CAR basado en KIR en cánceres que incluyen tumores sólidos.

Los CAR de "primera generación" se diseñaron mediante la incorporación de un dominio citoplasmático que contiene el motivo de activación basado en la inmunotribosina (ITAM) en un único receptor quimérico que utiliza un fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo para la orientación específica del antígeno (Sadelain et al., *Cancer discovery*, 3(4):388-98, 2013). Posteriormente se incorporaron en tándem a estos receptores una serie de dominios de señalización adicionales diferentes de receptores coestimuladores como CD28, ICOS, 4-1BB y OX-40 para mejorar la proliferación, la supervivencia y la función de las células T (Finney HM et al. *J Immunol.* 1998;161:2791-2797; Maher J. et al. *Nat Biotech* 2002; 20:70-75; Finney HM et al. *J Immunol.* 2004; 18:676-684; Milone et al., 2009, *Mol Ther* 17(8):1453-64; Carpenito et al., 2009, *Proc Natl Acad Sci USA* 106(9):3360-5). Estos CAR de "segunda generación" (un dominio coestimulador) y de "tercera generación" (2 dominios coestimuladores) demuestran una función mejorada en modelos animales preclínicos de cáncer, y varios CAR potenciados por la coestimulación se encuentran actualmente en ensayos clínicos en humanos de fase temprana para el cáncer (revisados en Barrett DM et al. *Ann Rev Med* 2014; 65:333-347).

Aunque los CAR de cadena única desencadenan una actividad citotóxica robusta específica de antígeno, los receptores naturales que utilizan los dominios ITAM altamente conservados están generalmente estructurados en complejos multicadena compuestos por cadenas separadas de unión al ligando y de señalización que contienen ITAM, como el complejo receptor de células T (TCR)-CD3, el complejo receptor de células B (BCR)-Ig α/β y el complejo receptor Fc (FcR). Los beneficios potenciales de un complejo inmunorreceptor multicadena son múltiples, incluyendo una mayor diversidad de señales disponibles a través de las múltiples interacciones entre la unión del ligando y las moléculas de señalización y la señalización sostenida de ITAM que es separable de la internalización de la cadena de unión del ligando (Sigalov et al., *Advances in experimental medicine and biology*, 640:ix-xi, 2008). Las consecuencias de la combinación de varios componentes del receptor que normalmente se encuentran en los receptores heterólogos en un CAR no se han dilucidado por completo; sin embargo, se ha observado anergia y señalización independiente del antígeno con algunos diseños (Brockner, *Blood*, 96(5):1999-2001, 2000; Brockner et al., *The Journal of experimental medicine*. 181(5):1653-9, 1995; Milone et al., *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(8):1453-64, 2009).

La divulgación describe CARs construidos a partir de un diseño de inmunorreceptor de cadena múltiple más "natural" que tiene mayor potencia en la activación de células T debido a las interacciones naturalmente seleccionadas entre las subunidades dentro del complejo del receptor y otros receptores dentro de las células inmunes. Se eligió el complejo inmunorreceptor de tipo inmunoglobulina asesina (KIR) y el inmunorreceptor multicadena DAP12 como base del CAR (Thielens et al., *Current opinion in immunology*, 24(2):239-45, 2012). Aunque se expresan en las células asesinas naturales, donde contribuyen a su citotoxicidad natural, también se ha observado la expresión de KIR en las células T CD4+ y CD8+ (Moretta et al., *Immunological reviews*, 155:105-17, 1997; Falk et al., *Human immunology*; 61(12): 1219-32, 2000; Remtoula et al., *Journal of immunology*, 180(5):2767-71, 2008). Los KIRs activadores, como el KIR2DS2, poseen un dominio citoplasmático corto sin actividad de señalización endógena conocida. Sin embargo, los KIR forman un complejo no covalente con dímeros de DAP12, una molécula adaptadora que contiene ITAM y que es capaz de unir las quinasas Syk y Zap70 en las células NK (Lanier et al., *Nature*, 391(6668):703-7, 1998). Además de estimular la citotoxicidad tras la unión del ligando, también se ha demostrado que los KIR presentan efectos coestimuladores dentro de las células T en ausencia de DAP12, lo que sugiere que estas moléculas podrían ser capaces de proporcionar tanto una actividad desencadenante primaria como una costimulación en las células T (Snyder et al., *Journal of immunology*, 173(6):3725-31, 2004).

Se construyó un CAR basado en KIR empalmado el SS1 scFv específico de mesotelina en el dominio transmembrana y citoplasmático corto del KIR activador, KIR2DS2 (SS1-KIRS2) como se ilustra esquemáticamente en la Figura 1 (Hassan et al., *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8(11):3520-6, 2002). La molécula adaptadora que contiene ITAM, DAP12, se expresa de forma constitutiva en las células asesinas naturales (NK), pero sólo se expresa en un subconjunto de células T humanas (Moretta *et al.*). Por lo tanto, se generó un vector lentiviral bicistrónico que codifica tanto el CAR basado en KIR específico para la mesotelina (SS1-KIRS2) como la molécula DAP12 separada por la secuencia del virus *Thoseaassigna 2A* (T2A) para lograr la coexpresión de ambas moléculas (Fig. 2). La transducción de células T humanas primarias con lentivirus SS1-KIRS2 y DAP12 biotrópico tras la activación anti-CD3 y anti-CD28 demostró una expresión superficial robusta de SS1-KIRS2 que era comparable a la del CAR SS1 ζ basado en CD3 ζ (Fig. 6). Las células T co-transductoras SS1-KIRS2/DAP12 se expandieron tras la estimulación policlonal anti-CD3/anti-CD28 con una cinética comparable a la observada con células T transductoras simuladas o con células T transductoras con un CAR específico de mesotelina que contenía el dominio citoplasmático CD3 ζ (datos no mostrados). Se compararon las actividades citotóxicas de las células T CAR basadas en KIR frente a las de CD3 ζ (SS1-z). Las células T transducidas por SS1-KIRS2/DAP12 mostraron una potente actividad citotóxica hacia las células K562 que expresan mesotelina humana (K-meso) con una magnitud similar a la del constructo SS1 ζ . Ninguno de los linfocitos T modificados demostró actividad lítica hacia K562 de tipo salvaje (Kwt), lo que apoya la activación específica del receptor SS1-KIRS2 por el antígeno diana mesotelina afín (Fig. 6).

Dado que se ha descrito la expresión de KIR2DS2 en las células T en ausencia de una expresión detectable de DAP12, se evaluó la expresión y la función del receptor SS1-KIRS2 con o sin cosuministro de DAP12. Utilizando un vector lentiviral que coexpresa DAP12 con la proteína roja fluorescente, dsRed (DAP12-dsRed) o un vector de control que expresa dsRed (dsRed), las células T fueron transducidas con el vector lentiviral DAP12 o el vector de control, seguido de la transfección con ARN transcrito *in vitro* que expresa SS1-KIRS2. SS1-KIRS2 se expresó en la superficie de las células T sin la adición de DAP12; sin embargo, la expresión superficial de SS1-KIRS2 aumentó en ~1 log con la adición de DAP12 (Fig. 12A). A pesar de la expresión de SS1-KIRS2, las células T sin DAP12 no lisan las células diana que expresan mesotelina, lo que demuestra un requisito de DAP12 en la actividad citotóxica de las células T desencadenada por SS1-KIRS2 (Fig. 12B). Estos datos no excluyen la posibilidad de que el KIR quimérico pueda proporcionar señales independientemente de su asociación con DAP12, tal y como se informó previamente para el receptor natural KIR2DS2 en clones de células T (Snyder *et al.*).

La asociación no covalente de KIR2DS2 natural y DAP12 depende de las interacciones electrostáticas entre un residuo de ácido aspártico en el dominio transmembrana (TM) de KIR y un residuo de lisina en el dominio TM de DAP12 (Feng et al., *PLoS biology*, 4(5):e142, 2006). Aunque se cree que la configuración de estos residuos de aminoácidos ionizables en los dominios TM de las subunidades TCR y CD3 difiere de la de los KIR y DAP12, lo que proporciona cierta especificidad a las interacciones, se investigó la posibilidad de que SS1-KIRS2 pudiera estar interactuando con componentes del complejo CD3 en lugar de con DAP12. Dado que la asociación entre el complejo CD3 y las cadenas del TCR es necesaria para la expresión del TCR en la superficie celular, se esperaba que la competencia del KIR por los componentes del CD3 interfiriera con la expresión normal del TCR, tal y como se ha observado previamente con la expresión de los TCR clonados. Se ha demostrado que la introducción de una cadena V β ectópica en las células T reduce la expresión superficial del TCR V β endógeno debido a la competencia durante el ensamblaje del complejo (Varela-Rohena et al., *Nature medicine*, 14(12):1390-5, 2008). La frecuencia e intensidad similares de TCR V β 13.1+ en las células T policlonales transducidas con KIRS2 en comparación con las células T de control transducidas de forma simulada apoya la ausencia de una interacción significativa entre SS1-KIRS2 y los miembros del complejo CD3 endógeno (Fig. 13).

Aunque la actividad citotóxica es una función efectora importante para la actividad antitumoral *in vivo* de las células T, la capacidad de un antígeno-receptor para desencadenar la secreción de citoquinas y la proliferación de células T también son características importantes que generalmente se correlacionan con una actividad antitumoral robusta *in vivo*. Por lo tanto, se comparó la secreción de interferón- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) desencadenada por antígeno por parte de células T modificadas con SS1-KIRS2/DAP12 con células T que llevan un CAR basado en CD3 ζ sin un dominio coestimulador (SS1- ζ) o con dominios coestimuladores CD28 o 4-1BB (SS1-28 ζ y SS1-BB ζ , respectivamente). El constructo SS1- ζ estimula la menor secreción tanto de IFN- γ como de IL-2 (Fig. 10, 11). La producción de interferón- γ es mayor y comparable en las células T que expresan SS1-KIRS2/DAP12 o SS1-BB ζ mientras que las células T que expresan el CAR SS1-28 ζ muestran una producción de IL-2 e IFN- γ significativamente mayor (Fig. 10). El análisis de un panel más amplio de citoquinas y quimioquinas demuestra que SS1-KIRS2/DAP12 estimula un patrón de expresión cualitativamente similar en todos los CAR basados en CD3 ζ con una magnitud de secreción de citoquinas y quimioquinas inducida por el antígeno que es comparable a los CAR SS1- ζ y SS1-BB ζ (Fig. 11).

El receptor SS1-KIRS2/DAP12 también fue un potente estimulador de la proliferación de células T en respuesta al antígeno cognado (Fig. 14). A diferencia del CAR SS1- ζ estándar que depende de señales coestimuladoras adicionales para una proliferación robusta, las células T SS1-KIRS2/DAP12 muestran una proliferación comparable a la del SS1 ζ con la adición del anticuerpo agonista anti-CD28. El mecanismo de la coestimulación proporcionada por SS1-KIR2 en ausencia de DAP12 podría estar relacionado con las interacciones de KIR con otras moléculas adaptadoras (Synder *et al.*). Otros receptores expresados naturalmente por las células T también pueden ser capaces de utilizar el DAP12 codirigido, contribuyendo además a la activación y proliferación de las células T. En particular, las integrinas pueden proporcionar señales coestimuladoras a las células T (Brunmark et al. (1996) *PNAS USA* 93(25):

14736-41 Zuckerman et al. (1998) J. Immunol. 160(7):3259-68). DAP12 parece ser fundamental para la señalización de afuera hacia adentro por parte de las integrinas en macrófagos y neutrófilos (Jakus et al. (2007) Trends in Cell Biol. 17(10):493-501 Mocsai et al. (2006) Nature Immunol. 7(12):1326-33), y puede conferir una actividad de señalización única a LFA-1 y otras integrinas en las células T que contribuyen a la actividad de SS1-KIRS2/DAP12.

5 El CD28 y el 4-1BB se han incorporado a los CAR para mejorar la actividad de las células T CAR *in vivo* (Carpenito et al. (2009) PNAS USA 106(9):3360-65); sin embargo, la coestimulación no siempre es capaz de superar el microambiente tumoral inmunosupresor. Recientemente se informó de que las células T CAR SS1-BB ζ inyectadas en ratones inmunodeficientes NOD-SCID- $\gamma_c^{-/-}$ (NSG) portadores de un xenoinjerto de células EM-meso (una línea celular derivada del derrame pleural de un paciente con mesotelioma maligno) se expanden *in vivo*, pero se vuelven hipofuncionales dentro del microambiente tumoral, lo que se asocia a un fracaso en la eliminación de los tumores (Moon et al. (2014) Clinical Cancer Res. 20:4262-4273). Se evaluó la actividad de las células T modificadas con SS1-KIRS2/DAP12 en este modelo de mesotelioma altamente resistente. Los CARs basados en SS1-KIRS2/DAP12 y CD3 ζ con o sin coestimulación son capaces de lisar las células EM-meso *in vitro* con una eficacia comparable. Las células T transducidas por Mock y DAP12-dsRed muestran una actividad lítica mínima hacia las células EM-meso (Fig. 36).
 10 Una única inyección intravenosa de células T simuladas, SS1 ζ y transducidas por SS1BB ζ no tuvo un efecto antitumoral observable en los xenoinjertos de EM-meso establecidos (Fig. 15A). El crecimiento del tumor se retrasó significativamente con las células T CAR SS1-28 ζ ; sin embargo, sólo las células T modificadas con SS1-KIRS2/DAP12 indujeron la regresión de los tumores con una supresión significativa del crecimiento del tumor EM-meso a los 52 días ($p < 0,001$, ANOVA con prueba F Scheffe post-hoc). Un segundo experimento en el que se compararon las células T que expresaban SS1-KIRS2/DAP12 con DAP12 solo o con células T modificadas con SS1-28 ζ mostró una actividad antitumoral mejorada similar de las células T SS1-KIRS2/DAP12 (Fig. 38). La sólida actividad de un CAR basado en KIR no es exclusiva de la especificidad de la mesotelina. También se construyó un CAR basado en KIR específico para CD19 con una actividad *in vitro* comparable a la de los CARs CD3 ζ de segunda generación (Fig. 16B). Las pruebas en un modelo de xenoinjerto de leucemia NALM-6 también mostraron que la eficacia de KIR-CAR es superior a la de un CAR de primera generación y comparable a la de un CAR de segunda generación con un dominio coestimulador 4-1BB.
 20
 25

Se realizó un análisis del injerto de células T y de los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) para explorar el mecanismo de la actividad antitumoral mejorada de las células T SS1-KIRS2/DAP12 en el modelo de xenoinjerto EM-meso. Sólo los ratones que recibieron las células T CAR SS1-BB ζ tenían células humanas CD45 (hCD45) positivas detectables en la sangre y el bazo, lo que concuerda con el efecto previamente observado del dominio coestimulador 4-1BB en la persistencia de las células T CAR+ *in vivo* (Milone et al.). Se detectaron pocos linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) hCD45+ en los ratones tratados con SS1 ζ o con el simulacro. Por el contrario, los tumores tratados con células T CAR SS1-KIRS2/DAP12, SS1-28 ζ y SS1-41BB ζ tenían TILs hCD45+ que comprendían el 2-4 % del total de células viables con frecuencias comparables para cada grupo (Fig 15B). La tinción inmunohistoquímica mostró TILs tanto CD8+ como CD4+ (datos no mostrados) dentro de los tumores de los ratones tratados con células T CAR SS1-KIRS2/DAP12, SS1-28 ζ y SS1-41BB ζ confirmando el análisis de citometría de flujo. Por lo tanto, la mayor eficacia de las células T SS1-KIRS2/DAP12 no está relacionada con la frecuencia de TIL dentro de los tumores en las últimas etapas de crecimiento del tumor. Dado que la comparación de los TILs está limitada por las grandes diferencias en el volumen del tumor en los puntos temporales tardíos, se evaluaron los puntos temporales más tempranos tras la inyección de células T. A los 10 días de la inyección de células T, se observaron frecuencias comparables de TILs hCD45+ en los grupos tratados con células T CAR SS1-28 ζ y SS1-KIRS2/DAP12, pero había pocos TILs CD45+ en el grupo de células T CAR SS1-BB ζ (Fig 15B). Un análisis limitado de estas TIL aisladas mostró que sólo las células T CAR SS1-KIRS2/DAP12 eran capaces de desarrollar una actividad lítica *in vitro* hacia las células EM-meso (datos no mostrados). Estos resultados indican que la acumulación retardada de las células T SS1-BB ζ en el tumor junto con la hipofunción inducida por el tumor subyacen a la escasa actividad antitumoral de estas células a pesar de su alta frecuencia en las últimas fases del desarrollo del tumor. Se repitió el experimento comparando las células T CAR SS1-28 ζ y SS1-KIRS2/DAP12 con el aislamiento de TIL a los 18 días de la inyección de células T para obtener un mayor número de TIL para el análisis fenotípico y funcional. Las TIL aisladas SS1-28 ζ demostraron una actividad citotóxica y una producción de IFN- γ específica de antígeno notablemente reducidas en comparación con las células T criopreservadas utilizadas para el tratamiento. Por el contrario, las TILs procedentes de tumores tratados con células T CAR SS1-KIRS2/DAP12 mostraron una citotoxicidad *in vitro* y una producción de IFN- γ comparables a las células criopreservadas (Fig 15E y Fig 37). La inmunotransferencia de lisados de proteínas de los TIL y de las células criopreservadas para la proteína CAR demostró la pérdida de expresión de CAR (datos no mostrados). La ausencia de CAR en las TILs puede deberse a la regulación a la baja de la expresión o a la escasa supervivencia de las células T CAR SS1-28 ζ en relación con las células T no transducidas dentro del microambiente tumoral.
 30
 35
 40
 45
 50
 55

En conclusión, los datos presentados en este documento demuestran que la combinación de CAR basados en KIR y DAP12 proporciona un sistema de receptor específico de antígeno altamente eficaz para conferir especificidad de antígeno artificial a las células T. A pesar de la relativa equivalencia de la actividad *in vitro*, se ha demostrado además que este CAR basado en KIR tiene una eficacia antitumoral muy superior a la de los CAR basados en CD3 ζ con uno o más dominios coestimuladores en el sistema tumoral modelo utilizado en este caso, quizá debido a una mayor resistencia a la inactivación. Se seguirán explorando los mecanismos de esta mayor eficacia y los diseños de receptores quiméricos basados en otros receptores de unión a ligandos asociados a DAP12, así como otros sistemas de receptores naturales que contienen ITAM, como FcR γ .
 60

Ejemplo 7: Un CAR basado en KIR puede coexpresarse con un KIR inhibidor natural que permite la regulación por la expresión de HLA en las células diana**Generación y caracterización de una línea celular K562-meso que expresa el ligando HLA-Cw de KIR2DL3**

5 *Material y procedimiento:* Las células K562 de tipo salvaje o una línea K562 previamente diseñada para expresar mesotelina (K562-meso) fueron transducidas con un vector lentiviral que codifica el alelo HLA-Cw3. Las células se clasificaron para la expresión uniforme de mesotelina y HLA-Cw3 mediante la clasificación celular activada por fluorescencia. La expresión de HLA-Cw3 se confirmó por citometría de flujo tras la tinción con el anticuerpo W6/32 anti-HLA A, B, C conjugado con APC.

10 *Resultado:* Se pueden generar líneas celulares K562 que expresen mesotelina o HLA-Cw3 solas o en combinación (Fig. 20).

Coexpresión de SS1-KIRS2 y KIR2DL3 en células T humanas primarias

15 *Material y procedimiento:* Se estimularon células T humanas primarias con microperlas anti-CD3/28, seguidas de la transducción con un vector lentiviral bicistrónico que expresaba DAP12 y SS1-KIRS2 solo o en combinación con un vector lentiviral que expresaba KIR2DL3 el día 1 tras la activación. La expresión del CAR SS1-KIRS2 se evaluó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal F(ab)₂ de cabra anti-ratón biotinilado seguido de SA-APC. La expresión de KIR2DL3 se determinó utilizando un anticuerpo monoclonal específico de KIR2D.

Resultado: Se pueden generar células T humanas primarias que expresen un CAR basado en KIR específico de mesotelina con DAP12 (KIRS2) solo, KIR2DL3 solo o una combinación de los dos receptores (Fig. 21).

KIR2DL3 coexpresado con un KIR CAR puede suprimir la citotoxicidad específica del antígeno en presencia de HLA-Cw en las células diana

20 *Material y procedimiento:* Se estimularon células T humanas primarias con microperlas anti-CD3/28, seguidas de la transducción con un vector lentiviral bicistrónico que expresaba DAP12 y SS1-KIRS2. Se introdujeron 5 µg de ARNm transcrito *in vitro* que codifica KIR2DL3 en las células T transducidas por lentivirus mediante electroporación tras 10 días de expansión *ex vivo*. Estas poblaciones de células T se mezclaron con células diana K562 marcadas con ⁵¹Cr (K562, K562-meso, K562-HLACw y K562-meso/HLACw) como se indica en relaciones variables de células T efectoras a células K562 diana (relación E:T). La citotoxicidad se determinó midiendo la fracción de ⁵¹Cr liberada en el sobrenadante a las 4 horas.

30 *Resultado:* Las células T que expresan SS1-KIRS2/DAP12 fueron capaces de matar a las células diana K562 que expresan mesotelina independientemente de la expresión de HLA-Cw3. Por el contrario, las células T que coexpresan el complejo de receptores SS1-KIRS2/DAP12 y el KIR inhibidor, KIR2DL3, no mostraron una citotoxicidad robusta contra las células K562 que expresaban mesotelina con HLA-Cw3; sin embargo, estas células demostraron una actividad citotóxica hacia las células K562 que expresaban mesotelina por sí solas comparable a la de las células T modificadas con SS1-KIRS2/DAP12. Estos resultados demuestran la capacidad de los receptores KIR inhibidores para regular la actividad funcional de los CARs basados en KIR activadores (Fig. 22).

Ejemplo 8: Un CAR basado en KIR con especificidad CD19 puede desencadenar la citotoxicidad de las células diana específicas de antígeno *in vitro* e *in vivo***Un CAR basado en KIR con especificidad CD19 puede desencadenar la citotoxicidad de la célula diana específica del antígeno *in vitro***

40 *Material y procedimiento:* Tras la activación de perlas anti-CD3/anti-CD28, las células T fueron transducidas con un vector lentiviral bicistrónico que expresaba DAP12 junto con un CAR basado en KIR específico para CD19 en el que el scFv derivado de FMC63 se fusionaba con KIR2DS2 de longitud completa (CD19-KIR2DS2) o un CAR basado en KIR generado mediante la fusión del scFv de FMC63 con el dominio transmembrana y citoplásmico de KIR2DS2 a través de un enlazador corto [Gly]₄-Ser(CD19-KIRS2). Las células T transducidas se cultivaron hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento, y la expresión del CAR basado en KIR específico para CD19 se evaluó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal F(ab)₂ de cabra anti-ratón biotinilado seguido de SA-PE. Se mezclaron células diana K562 marcadas con ⁵¹Cr con (K562-CD19) o sin (K562-wt) expresión de CD19 en relaciones variables con células T y células diana (relación E:T). La citotoxicidad se determinó midiendo la fracción de ⁵¹Cr liberada en el sobrenadante a las 4 horas. También se incluyeron células T de control que fueron transducidas de forma simulada (NTD) o transducidas con un CAR basado en CD3ζ específico para CD19 (CD19-z) como controles negativos y positivos, respectivamente.

50 *Resultado:* El análisis de citometría de flujo demuestra la expresión del scFv específico de CD19 en la superficie de las células T transducidas con CD19-KIR2DS2, CD19-KIRS2 y CD19-z (Fig. 16A). Los linfocitos T que expresan DAP12 con CD19-KIR2DS2 o CD19-KIRS2 fueron capaces de matar a las células diana de forma específica para el antígeno (Fig. 16B). La citotoxicidad mostrada por las células T modificadas con CAR basados en KIR fue comparable o superior a la de las células T que expresan un CAR basado en CD3ζ específico para CD19.

Las células T transducidas con CD19-KIRS2/DAP12 inducen la regresión tumoral en un xenoinjerto de leucemia humana

Material y procedimiento: Los ratones NOD-SCID- $\gamma_c^{-/-}$ (NSG) fueron injertados por vía intravenosa por la vena de la cola el día 0 con 1 millón de células tumorales Nalm-6 CBG, una línea celular de leucemia que expresa CD19. En el experimento, las células T fueron estimuladas con perlas estimuladoras anti-CD3/anti-CD28, seguidas de transducción lentiviral en el día 1 con una serie de CAR basados en CD3 con o sin un dominio coestimulador (CD19-z, CD19-BBz) o los CAR basados en KIR específicos para CD19, CD19-KIRS2 con DAP12, como se indica en la Figura. Como control se utilizaron células T transducidas simuladas (NTD). Las células T se expandieron hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento *ex vivo* y se inyectaron por vía intravenosa el día 5 después de la inyección de la línea celular leucémica con 2 millones de células T CAR por ratón. La carga tumoral se evaluó mediante imágenes bioluminiscentes. Se analizaron 5 animales para cada condición de células T (Fig. 17).

Resultado: En el experimento *in vivo* presentado (Fig. 17), las células T NTD no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento del tumor, mientras que las células T transducidas por CD19z, CD19BBz y CD19-KIRS2 muestran diversos efectos antitumorales. Los ratones infundidos con células T CD19z mostraron una ligera reducción de la carga tumoral, pero conservaron niveles detectables de luminiscencia. Por el contrario, la luminiscencia de las células tumorales en los ratones infundidos con células T CD19BBz o CD19KIRS2 descendió hasta el límite inferior de detección (Fig. 17B, línea punteada) sólo 7 días después de la inyección de células T, mostrando una eliminación completa fuera de un pequeño reservorio de células leucémicas en la raíz del diente inaccesible a las células T. En el día 15, la carga tumoral en el grupo de células T simuladas superó el punto final (2×10^{10} fotones/segundo) y fueron sacrificados, mientras que la luminiscencia en los grupos CD19BBz y CD19KIRS2 se mantuvo en el límite inferior de detección.

Ejemplo 9: Un CAR basado en el dominio VHH de un camélido puede expresarse en la superficie de una célula T en combinación con un CAR basado en scFv sin una interacción apreciable con el receptor.

Material y procedimiento: Las células T Jurkat que expresan GFP bajo un promotor dependiente de NFAT (NF-GFP) fueron transducidas con un CAR activador específico de mesotelina (SS1-CAR), activador específico de CD19 (19-CAR) o un CAR generado utilizando un dominio VHH de camélido específico de EGFR (VHH-CAR). Tras la transducción con el CAR activador, las células se transducen con un CAR inhibidor adicional que reconoce a CD19 (19-PD1) para generar células que coexpresen tanto el CAR activador como el inhibidor (SS1+19PD1, 19+19PD1 o VHH+19PD1). Las células T Jurkat transducidas se co-cultivaron durante 24 horas con diferentes líneas celulares que o bien 1) carecen de todos los antígenos diana (K562), 2) expresan mesotelina (K-meso), CD19 (K-19) o EGFR (A431) solamente, 3) expresan una combinación de EGFR y mesotelina (A431-mesotelina) o CD19 (A431-CD19) o 4) expresan una combinación de CD19 y mesotelina (K-19/meso). También se incluyeron condiciones adicionales que incluían células no estimuladoras (no stim) o K562 con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OKT3 (OKT3) como controles negativos y positivos para la activación de NFAT, respectivamente. La expresión de GFP, como marcador de la activación de NFAT, se evaluó mediante citometría de flujo.

Resultado: Los camellos y las especies relacionadas (por ejemplo, la llama) producen naturalmente anticuerpos que tienen un único dominio variable similar a la cadena pesada. Este dominio, conocido como dominio VHH de los camélidos, ha evolucionado para existir sin emparejarse con un dominio variable de la cadena ligera. La Fig. 27A muestra de forma esquemática la posibilidad de que dos moléculas heterólogas de scFv puedan disociarse y reasociarse entre sí cuando se muestran en la superficie de una célula, como se demuestra por la interrupción observada en la unión de scFv al ligando conocido durante la coexpresión del receptor (Fig 25 y Fig 26). La Fig. 27B muestra una representación esquemática de la interacción reducida esperada entre un CAR scFv desplegado en la superficie de una célula en combinación con un CAR basado en el dominio VHH. La Fig. 28 demuestra que la coexpresión de dos CAR basados en scFv (CAR activador SS1-z y CAR inhibidor CD19-PD1) en la superficie de un Jurkat conduce a la incapacidad del CAR activador (SS1-z) para reconocer su ligando afín en la célula diana y desencadenar la activación de las células T a pesar de la ausencia del ligando del receptor inhibidor. Esto es coherente con la reducción observada en la unión del ligando en la superficie (Fig. 25). En cambio, la coexpresión del mismo CAR inhibidor (CD19-PD1) con un CAR activador basado en VHH de camélidos (VHH-z) no tiene ningún impacto en la capacidad del CAR activador basado en VHH para reconocer su ligando EGFR afín. Estos datos apoyan el modelo representado en la Fig 27B de que un CAR activador basado en VHH puede expresarse con un CAR basado en scFv sin una interacción significativa entre los receptores debido a la reducida capacidad de interacción de los dominios scFv y VHH.

Ejemplo 10: Un NCR CAR basado en NKp46 con especificidad de mesotelina desencadena citotoxicidad específica de antígeno

Material y procedimiento: Tras la activación de perlas anti-CD3/anti-CD28, las células T fueron transducidas con un vector lentiviral bi-cistrónico que expresaba DAP12 y SS1-KIRS2 (control), o Fc ϵ R γ y un CAR basado en NKp46 específico para la mesotelina (SS1-NKp46) o Fc ϵ R γ y un CAR NKp46 específico para la mesotelina en el que el dominio extracelular natural de NKp46 estaba truncado (SS1-TNKp46). La expresión de los CARs específicos de mesotelina se evaluó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal F(ab)2 de cabra anti-ratón biotinilado seguido de SA-PE (Figura 18). Las células T se mezclaron con células diana K562 marcadas con ^{51}Cr que expresaban mesotelina en relaciones variables de células T efectoras y células K562 diana (relación E:T). La citotoxicidad se

determinó midiendo la fracción de ^{51}Cr liberada en el sobrenadante a las 4 horas en comparación con la liberación espontánea.

Resultado: Tanto los receptores SS1-NKp46 como los SS1-NKp46 muestran una expresión superficial en las células T. Las células T transducidas por SS1-NKp46 muestran una citotoxicidad robusta de la célula diana que es comparable al CAR basado en KIR SS1-KIRS2. El SS1-NKp46 mostró una actividad citotóxica más débil que sólo fue evidente en relaciones elevadas de células efectoras a células diana (Fig. 18). Estos datos demuestran que se puede generar un inmunorreceptor quimérico específico de antígeno para su uso en la reorientación de la actividad citolítica de las células T a partir de los receptores naturales de citotoxicidad (NCR) utilizando un diseño similar al utilizado para crear un CAR basado en KIR.

Ejemplo 11: Interacción de los dominios scFv

Material y procedimiento: En la Figura 24, se transducen células T Jurkat con un vector lentiviral que codifica un CAR basado en KIR inhibitor específico de mesotelina (SS1-KIR2DL3). A continuación, estas células transducidas se transducen con diluciones variables de un vector lentiviral que codifica un CAR basado en KIR activador específico de CD19 (CD19-KIR2DS2). Estos KIR-CARs se muestran esquemáticamente en la Figura 23. Tras la transducción con ambos CARs, la frecuencia de células con expresión superficial de un CAR con un scFv intacto capaz de unirse a su ligando objetivo se evaluó por citometría de flujo tras la tinción con una proteína de fusión mesotelina-Fc seguida de un anticuerpo secundario anti-Fc marcado con PE y un anticuerpo monoclonal anti-CD 19 específico (clon FMC63) marcado con APC. En la Figura 25, se transducen células T humanas primarias activadas con anti-CD3/28 con diferentes vectores lentivirales que codifican un CAR basado en CD3z específico para mesotelina con una fusión de mCherry en el extremo C (SS1z-mCh), un CAR específico para CD19 con CD3z y el dominio citoplasmático 4-1BB (19bbz) o una combinación de ambos SS1z-mCh y 19bbz. La expresión de mCherry y de un SS1 scFv funcional se evaluó por citometría de flujo tras la tinción con una proteína de fusión mesotelina-Fc seguida de un anticuerpo secundario anti-Fc marcado con FITC. En la Figura 26, las células T humanas primarias activadas con anti-CD3/28 fueron transducidas con diferentes vectores lentivirales que codificaban un CAR basado en CD3z específico de mesotelina (SS1z) un CAR específico de CD19 con el scFv FMC63 (19bbz) o un CAR específico de CD19 con el scFv 21d4 (21d4bbz) o un CAR específico de CD19 con el scFv BL22 (BL22bbz) en el que el scFv estaba compuesto por un dominio variable de cadena pesada (VH) 5' al dominio variable de cadena ligera (VL) en el scFv (H2L) o el VL situado 5' al VH (L2H). Después de la transducción con cada uno de los CAR específicos de CD19, las células T fueron co-transducidas con SS1z. La unión del SS1z a la mesotelina y la expresión superficial del scFv anti-CD 19 se evaluó por citometría de flujo tras la tinción con una proteína de fusión mesotelina-Fc seguida de un anticuerpo secundario anti-Fc marcado con FITC o proteína L biotinilada seguida de APC conjugado con estreptavidina.

Resultado: La Fig. 24 muestra que la coexpresión de dos CARs intactos basados en scFv de unión a ligando (SS1-KIR2DL3 y CD19-KIR2DS2) en la superficie celular es mutuamente excluyente. La Figura 26 demuestra que la pérdida de la unión del ligando ocurre a pesar de la expresión del CAR en la célula como se ilustra por la presencia de células que expresan mCherry con una unión reducida de mesotelina en células co-transducidas con SS1z-mCh y 19bbz. La Figura 26 demuestra que la interacción entre los scFv que conduce a la pérdida de la función de unión de los scFv puede observarse utilizando diferentes CAR basados en scFv, lo que apoya la naturaleza universal de este efecto. Estas observaciones son consistentes con el modelo representado en la Fig. 27, panel A, en el que el dominio variable de un scFv puede sufrir un emparejamiento intermolecular con un receptor quimérico basado en un scFv heterólogo, lo que lleva a la pérdida de unión por parte del scFv dentro de un único CAR.

Ejemplo 12: Un receptor quimérico de antígenos (CAR) basado en un receptor similar a la inmunoglobulina asesina (KIR) desencadena una actividad citotóxica en los tumores sólidos

Los receptores antigénicos quiméricos (CARs) basados en una única molécula quimérica con un dominio de unión a antígeno unido en *cis* a los dominios citoplásmicos de CD3 ζ y a los receptores coestimuladores CD28 o 4-1BB proporcionan un procedimiento potente para la ingeniería de la citotoxicidad de las células T hacia los tumores. Se utilizó un receptor quimérico multicadena basado en los receptores tipo inmunoglobulina asesina (KIR) que normalmente expresan las células asesinas naturales (NK) y las células T. Construido mediante la fusión de un fragmento variable de cadena única (scFv) con el dominio transmembrana y citoplásmico de un KIR, se demostró que un CAR basado en KIR direccionado a la mesotelina (SS1-KIR) desencadena una actividad citotóxica específica del antígeno y una producción de citoquinas que es comparable a los CAR basados en CD3 ζ con una proliferación inducida por el antígeno que es independiente de la coestimulación adicional. Utilizando un modelo de xenoinjerto de mesotelioma resistente a la inmunoterapia con células T, se demostró además que un CAR basado en KIR direccionado a la mesotelina presenta una actividad antitumoral más potente en comparación con las células T que llevan CARs basados en CD3 ζ específicos para la mesotelina con coestimulación a pesar de la persistencia *in vivo* de estas últimas células T modificadas con CAR. La evaluación de los linfocitos infiltrados en el tumor demuestra que las células T CAR+ basadas en KIR muestran resistencia a la hipofunción adquirida dentro del microentorno tumoral en comparación con los CAR basados en CD3 ζ con dominios de receptores coestimuladores. La capacidad de un CAR basado en KIR para inducir la regresión de un tumor en el que los CAR basados en CD3 ζ de segunda generación muestran una actividad limitada apoya la futura evaluación clínica de un CAR basado en KIR en el mesotelioma y otros tumores, por ejemplo, otros tumores sólidos.

Ejemplo 13: Actividad antitumoral *in vivo* de CARs específicos de mesotelina

De manera similar al experimento en xenoinjerto descrito en el Ejemplo 6, se probó una serie de constructos CAR basados en mesotelina en un modelo de mesotelioma para evaluar la actividad antitumoral *in vivo*. Se probaron tres constructos CAR específicos para la mesotelina (como se muestra en la Figura 39): un constructo CAR de segunda generación que contenía el dominio de unión al antígeno SS1 y un dominio citoplásmico que contenía los dominios de señalización intracelular CD28 y CD3zeta (SS1-28 ζ , Fig. 39C), un KIR-CAR multicadena que contiene el dominio de unión al antígeno SS1 y un dominio citoplásmico KIR2DS2 en una cadena, y la molécula adaptadora DAP12 en otra cadena (SS1-KIRS2/DAP12, Fig. 39A), y un KIR-CAR de cadena única que contiene el dominio de unión al antígeno SS1 y un dominio citoplásmico que contiene DAP12 (SS1-DAP12, Fig. 39B). El dominio transmembrana del constructo SS1-DAP12 utilizado era un dominio transmembrana CD8.

Se inyectaron ratones NSG adultos por vía subcutánea con 2×10^6 células EM-meso como se ha descrito anteriormente, y en el Ejemplo 6. Las células T humanas primarias fueron transducidas con SS1-28 ζ , SS1-KIRS2/DAP12, SS1-DAP12, logrando una eficiencia de transducción del 90 %, o fueron transducidas de forma simulada. Se inyectaron por vía intravenosa 3×10^6 de las células T humanas primarias transducidas por CAR o simuladas el día 20 después de la implantación del tumor. El volumen del tumor se midió con un calibrador utilizando la fórmula $(\pi/6) \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$ en los momentos indicados ($n = 5$ ratones por grupo). El volumen del tumor se comparó entre los grupos de tratamiento con células T CAR en el día 40 (nadir de la regresión del tumor) y en el día 52 (final del experimento) mediante un ANOVA de una vía ($p < 0,001$) con comparaciones entre grupos realizadas por una prueba F de Scheffe post-hoc. * indica que es estadísticamente diferente del control simulado en ambos puntos temporales ($p < 0,001$).

Como se muestra en la Figura 40, SS1-DAP12 mostró actividad antitumoral, lo que resultó en la reducción del volumen del tumor en comparación con los controles de células T transducidas y no transducidas. SS1-KIRS2/DAP12, de forma similar a los resultados descritos en el Ejemplo 6, mostró una actividad antitumoral robusta equivalente a la lograda por el constructo SS1-28 ζ .

Ejemplo 14: Actividad *in vitro* de NKR- CARs que contienen dominios de unión a antígeno humano que se unen a la mesotelina

Se generaron NKR-CARs que contienen dominios de unión a antígenos humanos que se unen a la mesotelina. Las secuencias de scFv humanas que se unen a la mesotelina, M-5, M-11, M-12, M-14, M-16, M-17, M-21 y M-23, como se indica en la Tabla 4, se fusionaron a un dominio transmembrana y a un dominio citoplásmico derivado de KIR2DS2, en adelante denominado huMeso-KIRS2. Se generaron constructos lentivirales como se ha descrito en ejemplos anteriores, por ejemplo, un vector lentiviral bicistrónico que comprende además el DAP12, unido al NKR-CAR por el sitio de corte del péptido T2A. Se realizaron varios ensayos *in vitro* para evaluar la actividad CAR de los NKR-CAR específicos de mesotelina que contienen scFvs humanos anti-mesotelina.

Expresión de la superficie

Se realizó un ensayo para determinar la expresión superficial de los constructos huMeso-KIRS2 en células T humanas primarias. Las células T humanas primarias se simularon con perlas activadoras de células T anti-CD3/anti-CD28 (Dynabeads® CD3/CD28 CTS™, Life Technologies). Tras 24 horas de estimulación, las células T fueron transducidas con un vector lentiviral que codificaba los CARs huMeso-KIRS2: M-5, M-11, M-12, M-14, M-16, M-17, M-21 y M23, o los controles SS1-PLENS y SS1-PTRPE. Las células se expandieron durante 7-8 días, y se analizaron por citometría de flujo para la expresión del CAR indicado utilizando mesotelina soluble-V5-Hisx12 seguido de un anticuerpo conjugado con FITC para el epítipo V5, o un anticuerpo antihumano de cabra biotinilado seguido de un SA conjugado con PE. La expresión superficial de los constructos huMeso-KIRS2 se cuantificó mediante análisis de citometría de flujo, como se muestra en la Figura 41. Los constructos huMeso-KIRS2 demostraron su expresión en la superficie de las células T humanas primarias.

Citotoxicidad

También se ensayó la actividad citotóxica específica de las células CAR que expresan huMeso-KIRS2. Se mezclaron células T humanas primarias que expresaban huMeso-KIRS2 con células diana que expresaban mesotelina marcadas con ^{51}Cr (células K562 modificadas para expresar mesotelina, K562-meso) o células diana de control que no expresaban mesotelina (células K562, K562) en relaciones variables de células T efectoras y células diana (0:1, 10:1, 20:1 y 30:1). La citotoxicidad se determinó midiendo la fracción de ^{51}Cr liberada en el sobrenadante después de 4 horas. Como se esperaba en el experimento de control con células de control que no expresan mesotelina (K562), ninguna de las células que expresan CAR demostró una cantidad significativa de citotoxicidad. En la Figura 42B, las células no transducidas (NTD) no demostraron citotoxicidad específica del antígeno. HuMeso-KIRS2 que contiene M-23 y M-12 scFvs demostró poca citotoxicidad específica de antígeno. Sin embargo, los huMeso-KIRS2 que contenían M-5, M-11, M-16, M-17 y M-21 demostraron una citotoxicidad específica de antígeno significativa a niveles similares a los de los controles que contenían SS1.

Producción de citoquinas

También se evaluó la producción de citoquinas de las células CAR que expresan huMeso-KIRS2. Se simulon células T humanas primarias, se transdujeron con el huMes-KIRS2 y se expandieron como se ha descrito previamente. Tras la expansión, las células T transducidas se mezclaron con células K562 (células negativas a la mesotelina, barras vacías) o con células K562 modificadas para expresar mesotelina (barras negras) en una relación de 2:1. Las concentraciones de citoquinas (IFN γ e IL-2) se determinaron en los sobrenadantes tras 24 horas de estimulación mediante ELISA para las citoquinas indicadas. Como se muestra en la Figura 43A, M-5, M-11, M-14, M-16, M-17 y M-23 que contienen células CAR que expresan huMeso-KIRS2 produjeron IFN γ . Como se muestra en la Figura 43B, M-5, M-11, M16 y M17 que contienen células que expresan huMes-KIRS2 produjeron IL-2.

Ejemplo 15: Una dosis baja de RAD001 estimula la proliferación de CART en un modelo de cultivo celular

El efecto de dosis bajas de RAD001 sobre la proliferación de células T CAR *in vitro* se evaluó mediante el cocultivo de células que expresan CART con células diana en presencia de diferentes concentraciones de RAD001.

Materiales y procedimientos**Generación de células T transducidas por CAR**

Se utilizó un vector de transferencia lentiviral humanizado anti CD19 CAR (huCART19) para producir el material genómico empaquetado en partículas lentivirales pseudotipadas VSVg. La secuencia de aminoácidos y de nucleótidos del CAR anti-humano CD19 humanizado (huCART19) es el CAR 1, ID 104875 descrito en la Publicación PCT, WO2014/153270, presentada el 15 de marzo de 2014, y se designa como SEQ ID NOs. 85 y 31 del mismo.

El ADN del vector de transferencia lentiviral se mezcla con los tres componentes de empaquetamiento VSVg env, gag/pol y rev en combinación con el reactivo lipofectamina para transfectar células Lenti-X 293T. El medio se cambia después de 24 horas y 30 horas después, el medio que contiene el virus se recoge, se filtra y se almacena a -80 °C. Los CARTs se generan mediante la transducción de células T ingenuas frescas o congeladas obtenidas por selección magnética negativa de sangre de donantes sanos o leukopak. Las células T se activan mediante la incubación con perlas anti-CD3/anti-CD28 durante 24 horas, tras lo cual se añade a los cultivos el sobrenadante viral o el virus concentrado (MOI=2 o 10, respectivamente). Se deja que las células T modificadas se expandan durante unos 10 días. El porcentaje de células transducidas (que expresan los CAR en la superficie celular) y el nivel de expresión de los CAR (intensidad de fluorescencia relativa, Geo Mean) se determinan mediante análisis de citometría de flujo entre los días 7 y 9. La combinación de la ralentización de la tasa de crecimiento y la aproximación del tamaño de las células T ~350 fL determina el estado para que las células T sean criopreservadas para su posterior análisis.

Evaluación de la proliferación de CARTs

Para evaluar la funcionalidad de las CARTs, las células T son descongeladas y contadas, y la viabilidad es evaluada por Cellometer. El número de células positivas para CAR en cada cultivo se normaliza utilizando células T no transducidas (UTD). El impacto de RAD001 en los CARTs se probó en titulaciones con RAD001, comenzando a 50nM. La línea celular utilizada en todos los experimentos de cocultivo es Nalm-6, una línea celular humana de leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células pre-B que expresa CD19 y está transducida para expresar luciferasa.

Para medir la proliferación de CARTs, las células T se cultivan con células diana en una relación de 1:1. El ensayo se lleva a cabo durante 4 días, cuando las células se tiñen para la expresión de CD3, CD4, CD8 y CAR. El número de células T se evalúa por citometría de flujo utilizando perlas de recuento como referencia.

Resultados

La capacidad proliferativa de las células CART se probó en un ensayo de co-cultivo de 4 días. Se evaluó el número de células T CD3 positivas para CAR (barras oscuras) y el total de células T CD3 positivas (barras claras) después de cultivar las células T transducidas y no transducidas con Nalm-6 (Fig. 39). Las células huCART19 se expandieron cuando se cultivaron en presencia de menos de 0,016 nM de RAD001, y en menor medida a concentraciones más altas del compuesto. Es importante destacar que tanto a 0,0032 como a 0,016 nM de RAD001 la proliferación fue mayor que la observada sin la adición de RAD001. Las células T no transducidas (UTD) no mostraron una expansión detectable.

Ejemplo 16: Una dosis baja de RAD001 estimula la expansión de CART *in vivo*

Este ejemplo evalúa la capacidad de las células huCAR19 de proliferar *in vivo* con diferentes concentraciones de RAD001.

Materiales y procedimientos:

Células NALM6-luc: La línea celular de leucemia linfoblástica aguda (LLA) humana NALM6 se desarrolló a partir de la sangre periférica de un paciente con LLA en recaída. A continuación, las células se marcaron con luciferasa de luciérnaga. Estas células en suspensión crecen en RPMI complementado con un 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor.

Ratones: Se recibieron ratones NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) de 6 semanas de edad del Jackson Laboratory (número de stock 005557).

Implantación del tumor: Las células NALM6-luc se cultivaron y expandieron *in vitro* en RPMI complementado con un 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor. A continuación, las células se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml y se lavaron dos veces con PBS estéril frío. A continuación se contaron las células NALM6-luc y se resuspendieron a una concentración de 10×10^6 células por mililitro de PBS. Las células se colocaron en hielo y se implantaron inmediatamente (en una hora) en los ratones. Las células NALM6-luc se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola en un volumen de 100 μ l, para un total de 1×10^6 células por ratón.

Dosificación de células T CAR: Se administraron a los ratones 5×10^6 células T CAR 7 días después de la implantación del tumor. Las células se descongelaron parcialmente en un baño de agua a 37 grados Celsius y luego se descongelaron completamente añadiendo 1 ml de PBS estéril frío al tubo que contenía las células. Las células descongeladas se transfirieron a un tubo falcon de 15 ml y se ajustaron a un volumen final de 10 ml con PBS. Las células se lavaron dos veces a 1000 rpm durante 10 minutos cada vez y luego se contaron en un hemocitómetro. A continuación, se resuspendieron las células T a una concentración de 50×10^6 células T CAR por ml de PBS frío y se mantuvieron en hielo hasta que se dosificaron los ratones. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa a través de la vena de la cola con 100 μ l de las células T CAR para una dosis de 5×10^6 células T CAR por ratón. Ocho ratones por grupo fueron tratados con 100 μ l de PBS solo (PBS), o con células T CAR CD19 humanizadas.

Dosificación del RAD001: Se formuló una microemulsión concentrada de 50 mg equivalente a 1 mg de RAD001 y se resuspendió en D5W (dextrosa al 5 % en agua) en el momento de la dosificación. Los ratones fueron dosificados diariamente por vía oral (a través de una sonda) con 200 μ l de las dosis deseadas de RAD001.

Análisis PK: Los ratones fueron dosificados diariamente con RAD001 a partir de los 7 días posteriores a la implantación del tumor. Los grupos de dosificación fueron los siguientes: 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg. Los ratones fueron sangrados en los días 0 y 14 después de la primera y última dosis de RAD001, en los siguientes puntos de tiempo para el análisis PK: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas.

Resultados:

La expansión y farmacocinética de RAD001 se probó en ratones NSG con tumores NALM6-luc. La dosis oral diaria de RAD001 por sí sola no tuvo impacto en el crecimiento de los tumores NALM6-luc (Figura 40). El análisis farmacocinético de RAD001 muestra que es bastante estable en la sangre de los ratones portadores de tumores (Figura 41A y 41B). Tanto el análisis PK del día 0 como el del día 14 muestran que las concentraciones de RAD001 en la sangre están por encima de los 10nM incluso 24 horas después de la dosificación a la dosis más baja probada (0,3 mg/kg).

Sobre la base de estas dosis, se dosificaron células T CAR huCAR19 con y sin RAD001 para determinar la capacidad proliferativa de estas células. La dosis más alta utilizada fue de 3 mg/kg, basada en los niveles de RAD001 en la sangre 24 horas después de la dosis. Como la concentración de RAD001 era superior a 10nM 24 horas después de la dosis final de RAD001, se utilizaron varias dosis inferiores de RAD001 en el estudio *in vivo* con células T CAR. Las células T CAR se dosificaron por vía intravenosa un día antes del inicio de la dosis oral diaria de RAD001. Los ratones fueron monitorizados mediante FACS para la expansión de las células T.

Las dosis más bajas de RAD001 muestran una mayor proliferación de las células T CAR (Figura 42). Esta mayor proliferación es más evidente y prolongada con las células T CAR CD4+ que con las células T CAR CD8+. Sin embargo, con las células T CAR CD8+, se puede observar una mayor proliferación en los primeros momentos tras la dosis de células T CAR. En las realizaciones, una célula de ARN CART también puede utilizarse en combinación con inhibidores del punto de control.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico de receptor de función inmune de células asesinas naturales (NKR-CAR), que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a la mesotelina y que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:234 o la SEQ ID NO: 240; el dominio transmembrana de KIR2DS2, y el dominio citoplasmático de KIR2DS2,
 5 en la que el dominio de unión a antígeno extracelular que se une a la mesotelina está conectado al dominio transmembrana por un dominio de bisagra, en la que el dominio de bisagra se selecciona del grupo que consiste en una bisagra CD8 una bisagra GS, una bisagra IgG4, una bisagra IgD, una bisagra KIR, una bisagra NCR, una bisagra SLAMF, una bisagra FcR, y una bisagra LY49, en la que el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático comprenden opcionalmente uno o más de un dominio KIR D0, un dominio KIR D1, y/o un dominio KIR D2.
2. Un polipéptido NKR-CAR aislado que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a la mesotelina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 234 o la SEQ ID NO: 240, el dominio transmembrana de KIR2DS2, y el dominio citoplasmático de KIR2DS2,
 15 en el que el dominio de unión a antígeno extracelular que se une a la mesotelina está conectado al dominio transmembrana por un dominio de bisagra, en el que el dominio de bisagra se selecciona del grupo que consiste en una bisagra CD8 una bisagra GS, una bisagra IgG4, una bisagra IgD, una bisagra KIR, una bisagra NCR, una bisagra SLAMF, una bisagra FcR, y una bisagra LY49, en el que el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático comprenden además opcionalmente uno o más de un dominio KIR D0, un dominio KIR D1, y/o un dominio KIR D2.
3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o el polipéptido NKR-CAR aislado de la reivindicación 2, en los que:
 20 (a) la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia líder que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
 (b) el dominio de bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 2, 3 o 4;
 (c) el dominio de bisagra comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 5 modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 2, 3 o 4;
 25 (d) el dominio de bisagra comprende una secuencia de aminoácidos con un 95-99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 2, 3 o 4; o
 (e) la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de bisagra comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 356, 16, 13, 14 o 15, o una secuencia de ácido nucleico con un 95-99 % de identidad con la misma; y/o
 30 (f) el NKR-CAR es un KIR-CAR, en el que el dominio extracelular de unión a antígeno que se une a la mesotelina está conectado al dominio transmembrana por un dominio de bisagra, en el que además el dominio de bisagra tiene menos de 50, 20 o 10 aminoácidos de longitud.
4. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o de la reivindicación 3, comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula adaptadora que comprende un dominio de señalización funcional de DAP12 o del receptor Fc épsilon gamma (FcεRγ), opcionalmente en la que:
 35 (a) dicha secuencia de ácido nucleico
 i) codifica una molécula adaptadora que comprende la secuencia de aminoácidos 1-113 de la SEQ ID NO: 333 o los aminoácidos 1-86 de la SEQ ID NO: 335;
 40 ii) codifica una molécula adaptadora que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones en los aminoácidos 1-113 de la SEQ ID NO: 333 o los aminoácidos 1-86 de la SEQ ID NO: 335;
 iii) codifica una molécula adaptadora que comprende una secuencia de aminoácidos con un 95-99 % de identidad con los aminoácidos 1-113 de la SEQ ID NO: 333 o los aminoácidos 1-86 de la SEQ ID NO: 335; o
 45 iv) comprende los nucleótidos 1-339 de la SEQ ID NO: 332 o los nucleótidos 1-258 de la SEQ ID NO: 334; y/o
 (b) la molécula de ácido nucleico aislada comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión peptídica seleccionado del grupo que consiste en T2A, P2A, E2A y F2A, y en la que el ácido nucleico que codifica el sitio de escisión peptídica enlaza la secuencia de ácido nucleico que codifica el NKR-CAR a la secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula adaptadora, opcionalmente en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica el sitio de escisión peptídica codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57, 58, 59 o 60; o una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia del 95-99 % con la misma.
5. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 4, o el polipéptido NKR-CAR aislado de la reivindicación 2, en la que:
 50 i) el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático comprenden colectivamente:
 (a) la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 413-487 de la SEQ ID NO: 333;
 (b) una secuencia de aminoácidos que tenga al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones en los aminoácidos 413-487 de la SEQ ID NO: 333; o

- (c) una secuencia de aminoácidos con un 95-99 % de identidad con los aminoácidos 413-487 de la SEQ ID NO: 333; o
- 5 ii) la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático comprende los nucleótidos 1237-1464 de la SEQ ID NO: 332, o una secuencia que tenga un 95-99 % de identidad con la misma.
6. Un complejo NKR-CAR, que comprende un NKR-CAR codificado por la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5 o el polipéptido NKR-CAR de la reivindicación 2, y una molécula adaptadora que es DAP12 o FcεRγ, opcionalmente en el que el NKR-CAR interactúa con la molécula adaptadora al unirse el dominio de unión a antígeno extracelular del NKR-CAR a la mesotelina.
- 10 7. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5, en el que el vector es un vector de ADN o un vector de ARN, opcionalmente en el que
- (i) el vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un vector lentiviral, un vector adenoviral y un vector retroviral; y/o
- (ii) el vector comprende además un promotor EF-1 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 11.
- 15 8. Una célula efectora inmune que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5, el polipéptido NKR-CAR de la reivindicación 2, el vector de la reivindicación 7, o el complejo NKR-CAR de la reivindicación 6, opcionalmente en la que la célula es una célula citotóxica, por ejemplo, una célula T o una célula NK.
- 20 9. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para fabricar una célula efectora inmunitaria, que comprende introducir en la célula efectora inmunitaria la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5 o el vector de la reivindicación 7.
10. Una célula según la reivindicación 8, para su uso como medicamento.
11. Una célula según la reivindicación 8, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor en un mamífero, en la que las células se administran en cantidad suficiente para proporcionar inmunidad antitumoral en el mamífero.
- 25 12. La célula para uso de la reivindicación 11, en la que el tumor se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, mesotelioma pleural maligno, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células escamosas, cáncer de pulmón de células grandes, cáncer de páncreas, adenocarcinoma ductal pancreático, metástasis pancreáticas, cáncer de ovario, cáncer colorrectal y cáncer de vejiga, o cualquier combinación de los mismos.

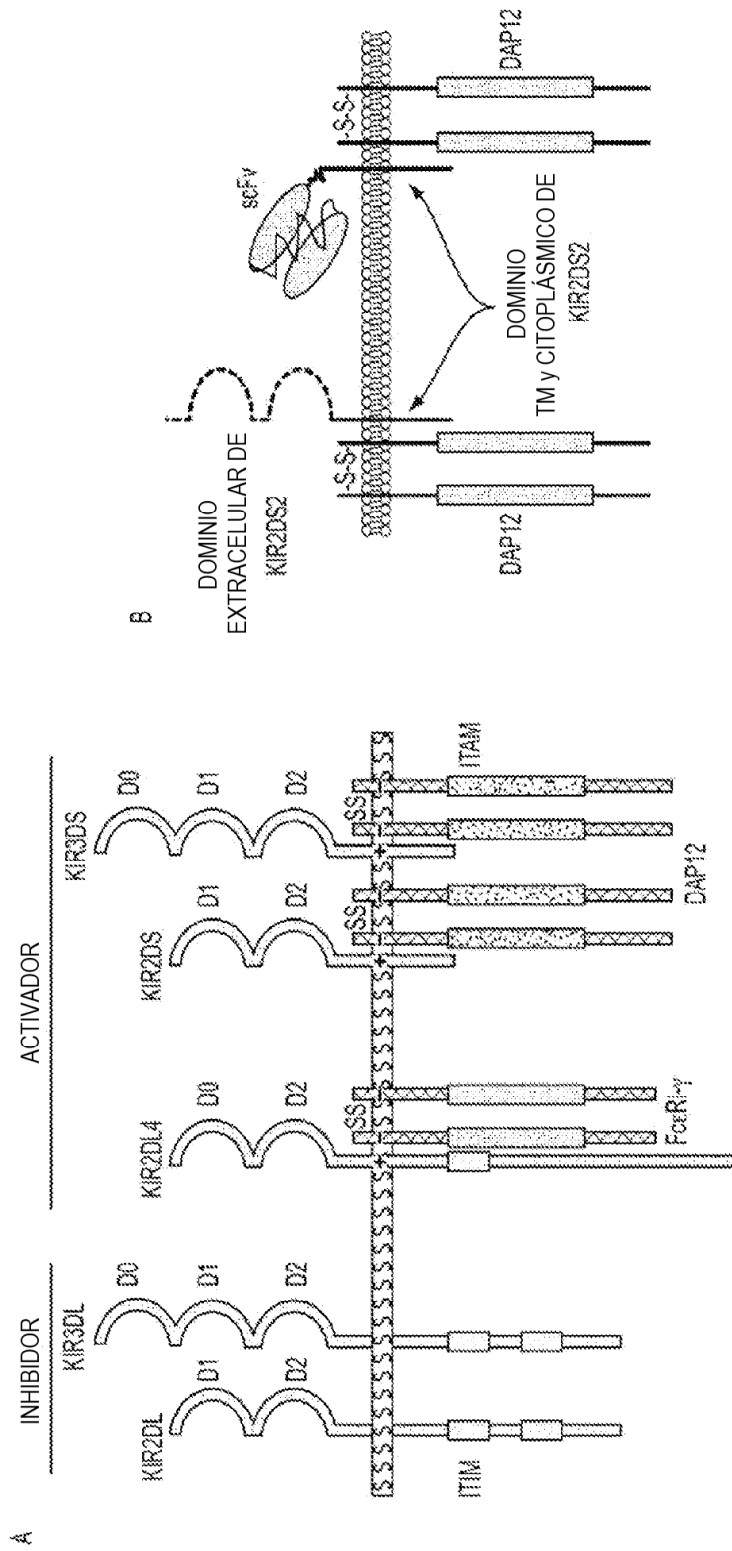


FIG. 1

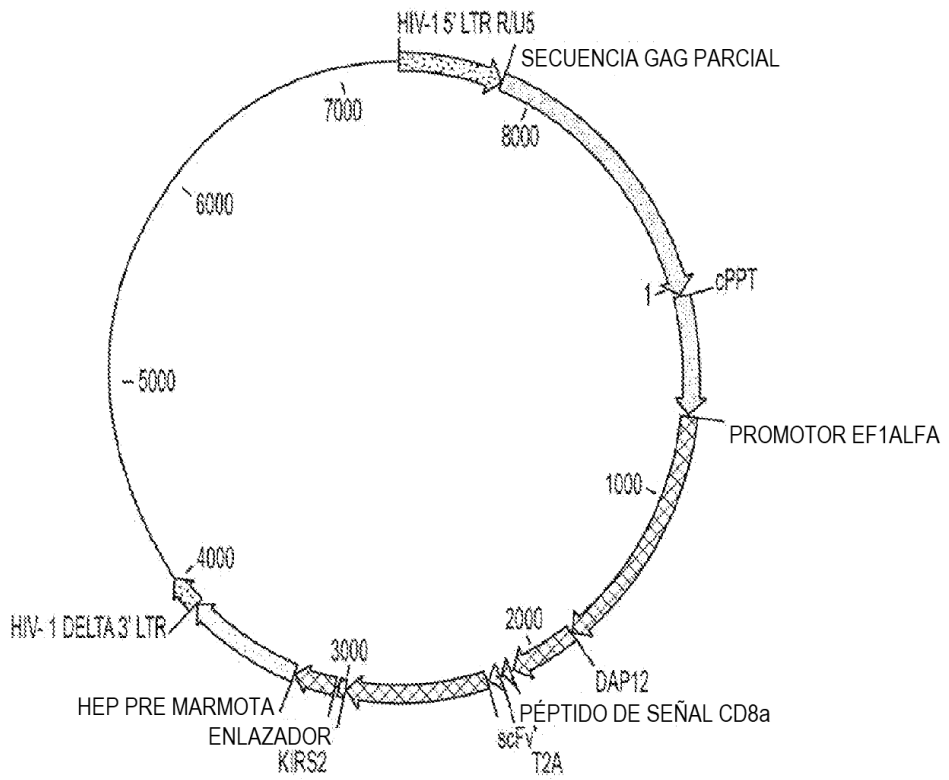


FIG. 2

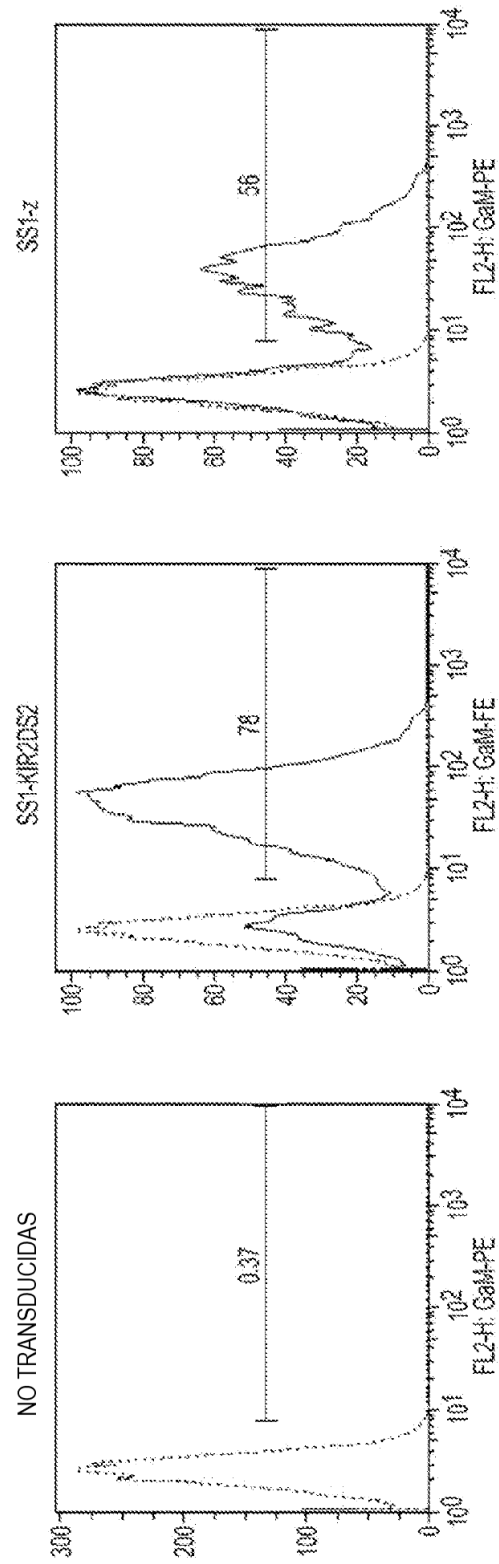


FIG. 3

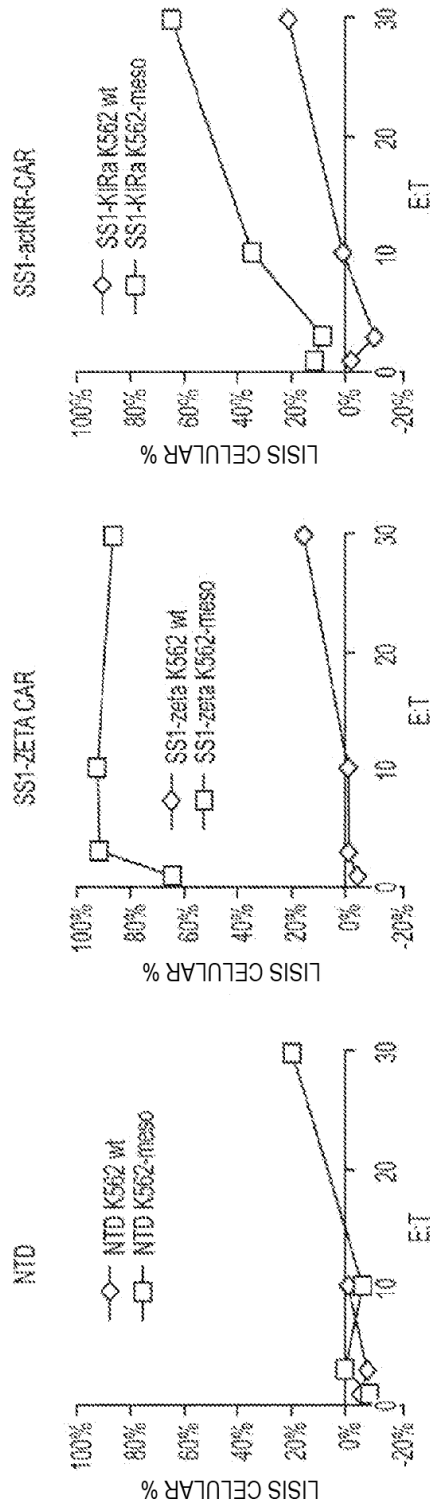
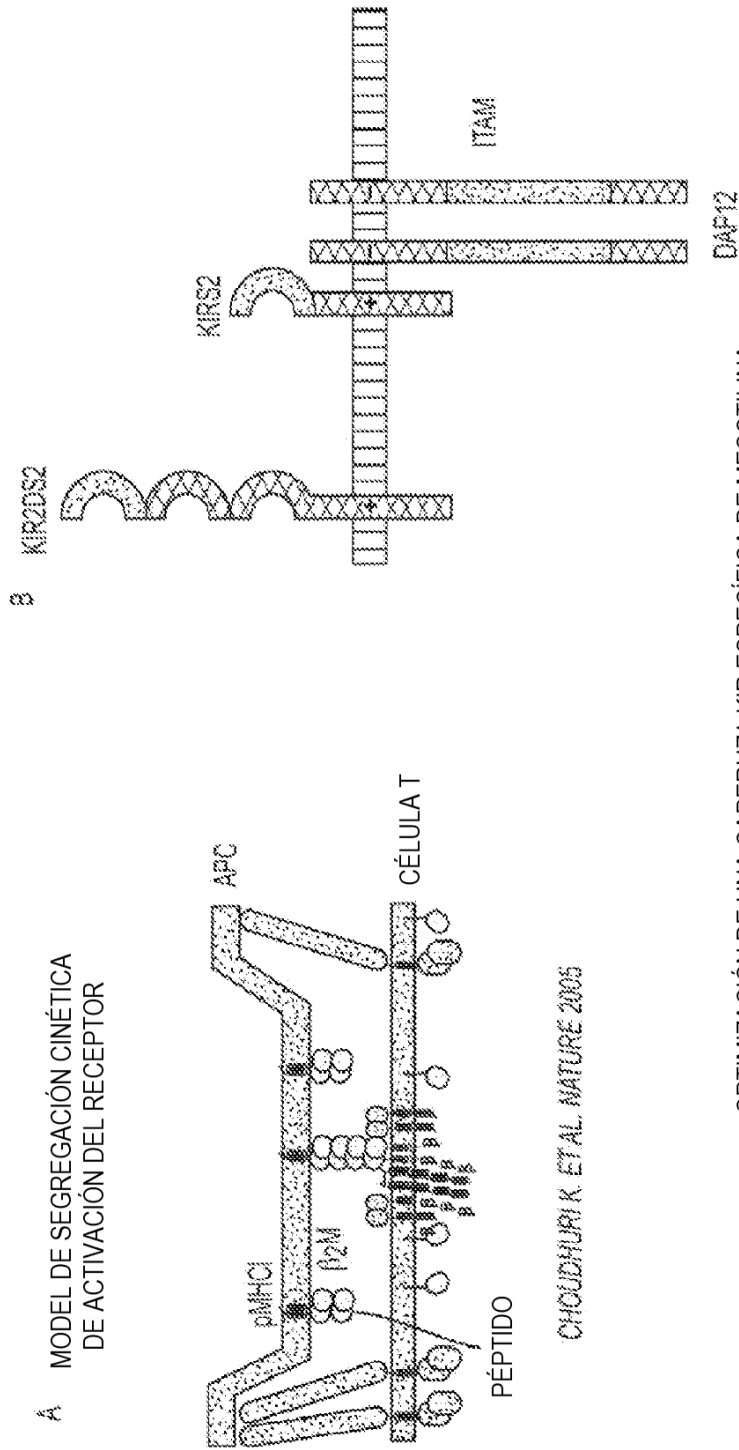


FIG. 4

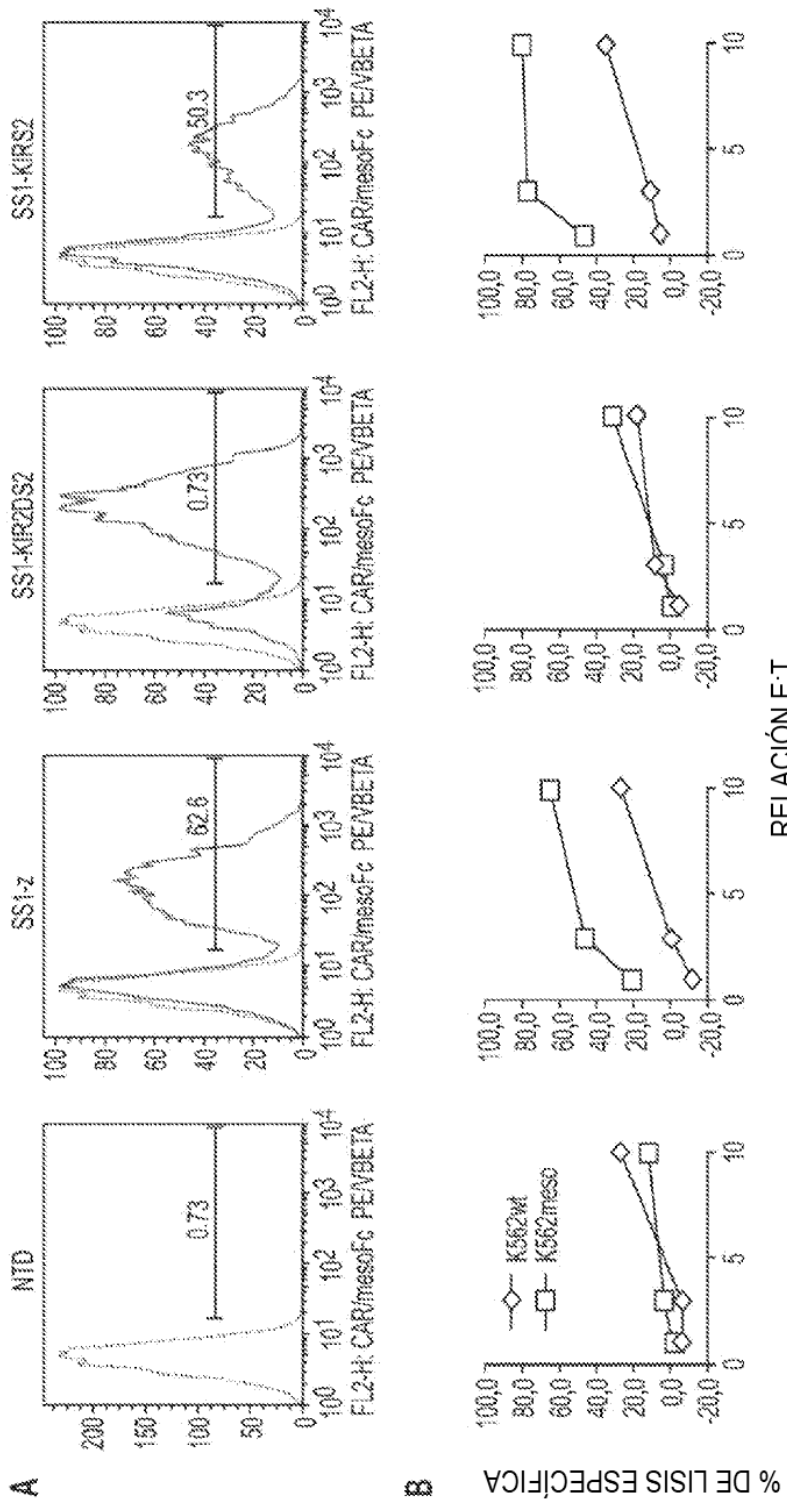


A MODEL DE SEGREGACIÓN CINÉTICA DE ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR

OPTIMIZACIÓN DE UNA CAPERUZA KIR ESPECÍFICA DE MESOTILINA VARIANDO LA LONGITUD DEL ECTODOMINIO DEL RECEPTOR

FIG. 5

CHOUDHURI ET AL. NATURE 2005



RELACIÓN E:T
FIG. 6

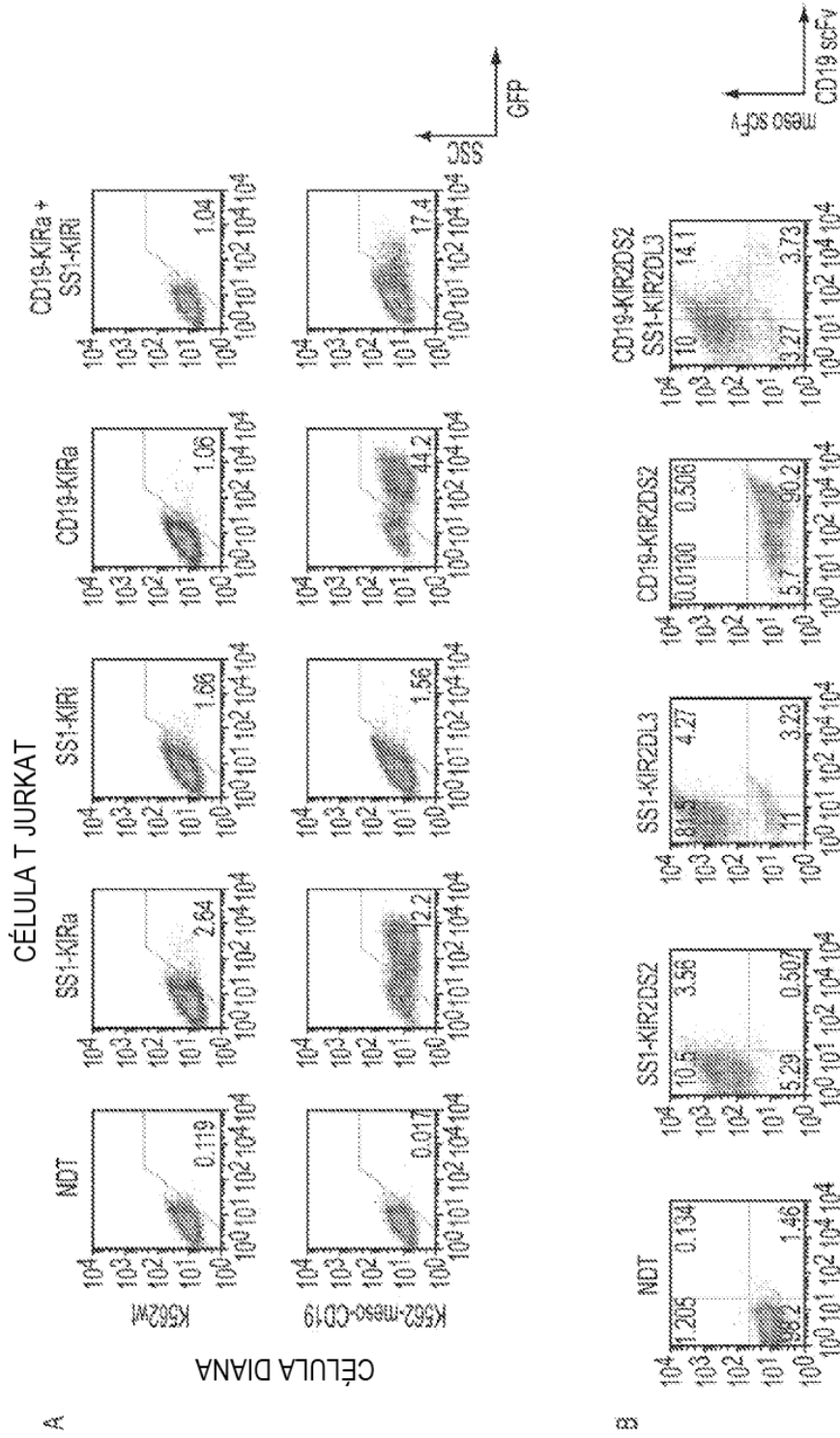


FIG. 7

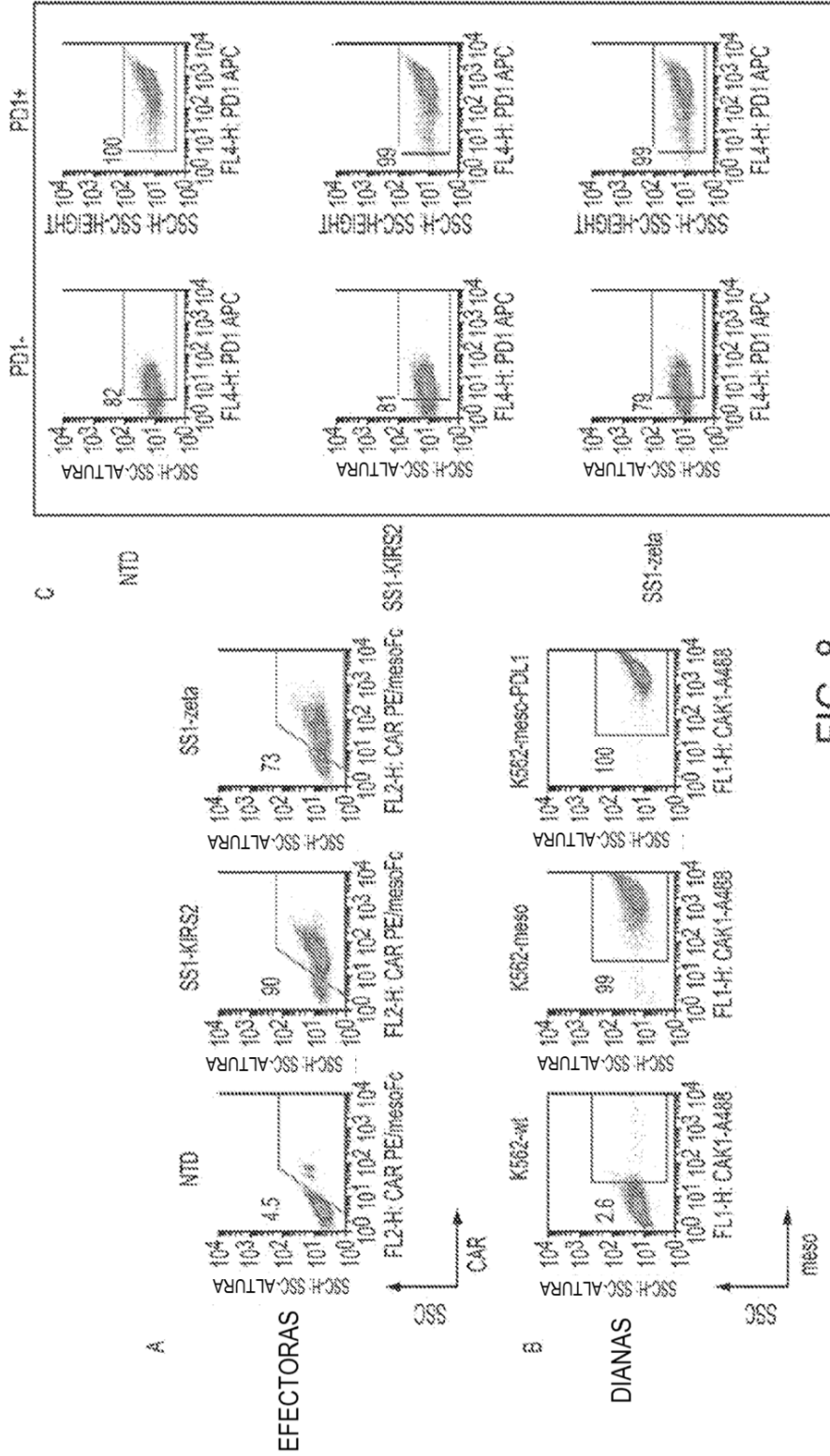


FIG. 8

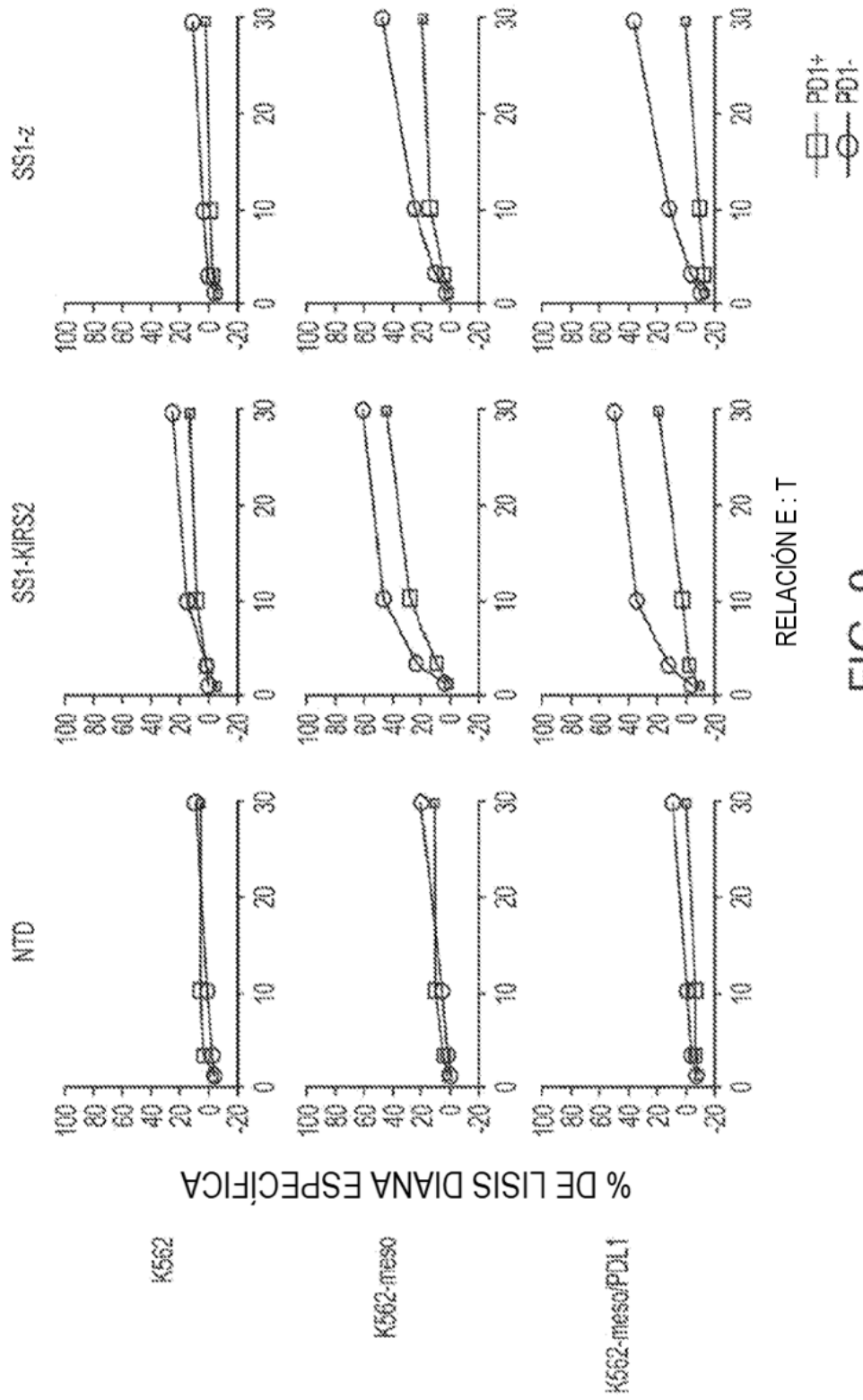


FIG. 9

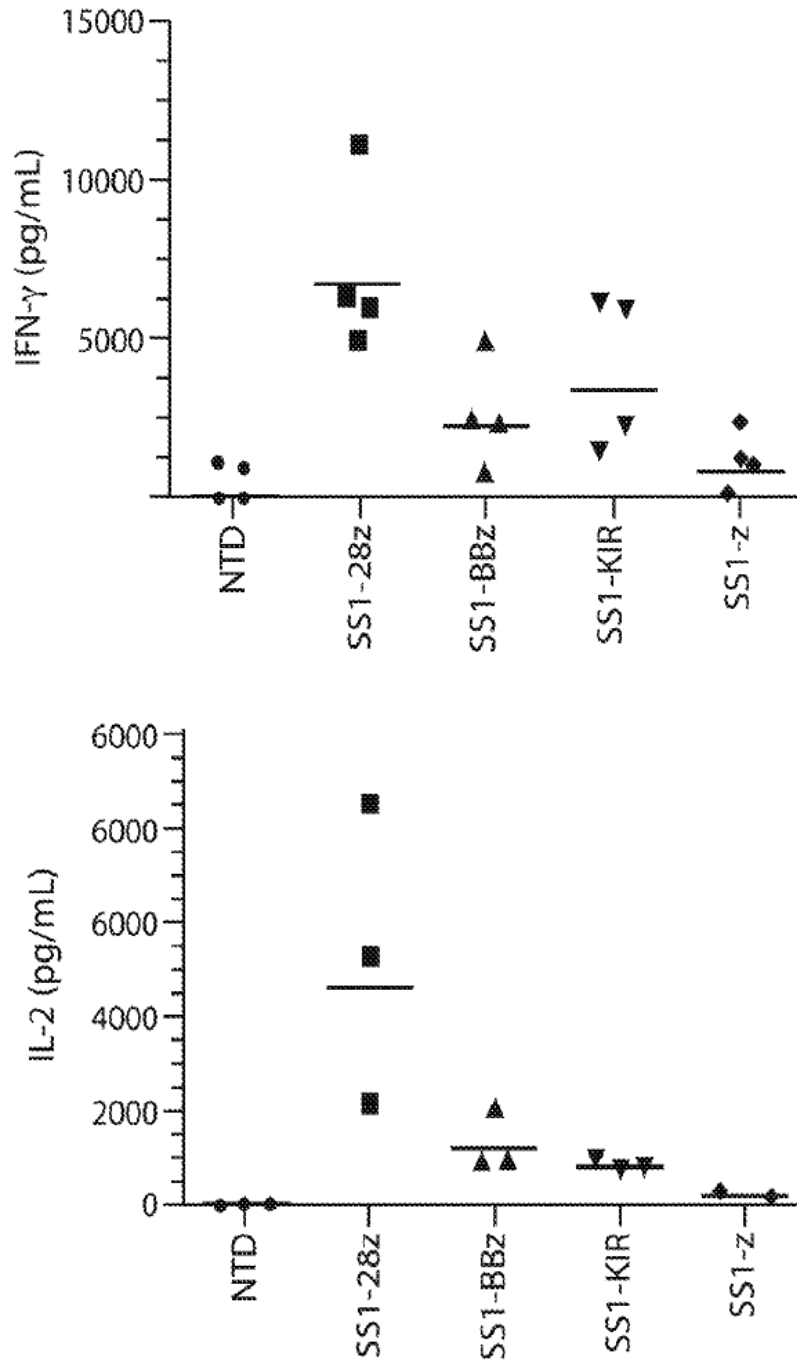


FIG. 10

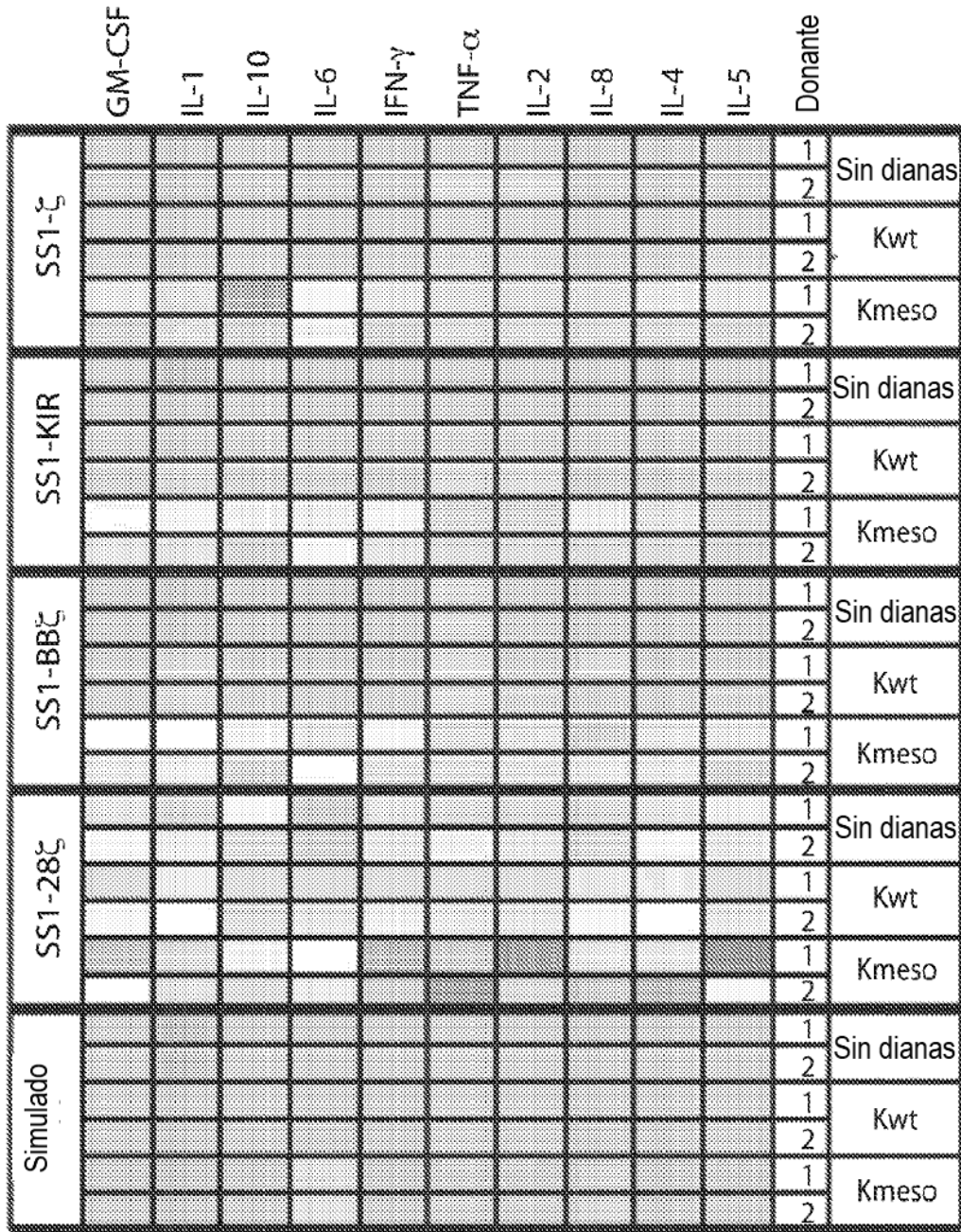


FIG. 11

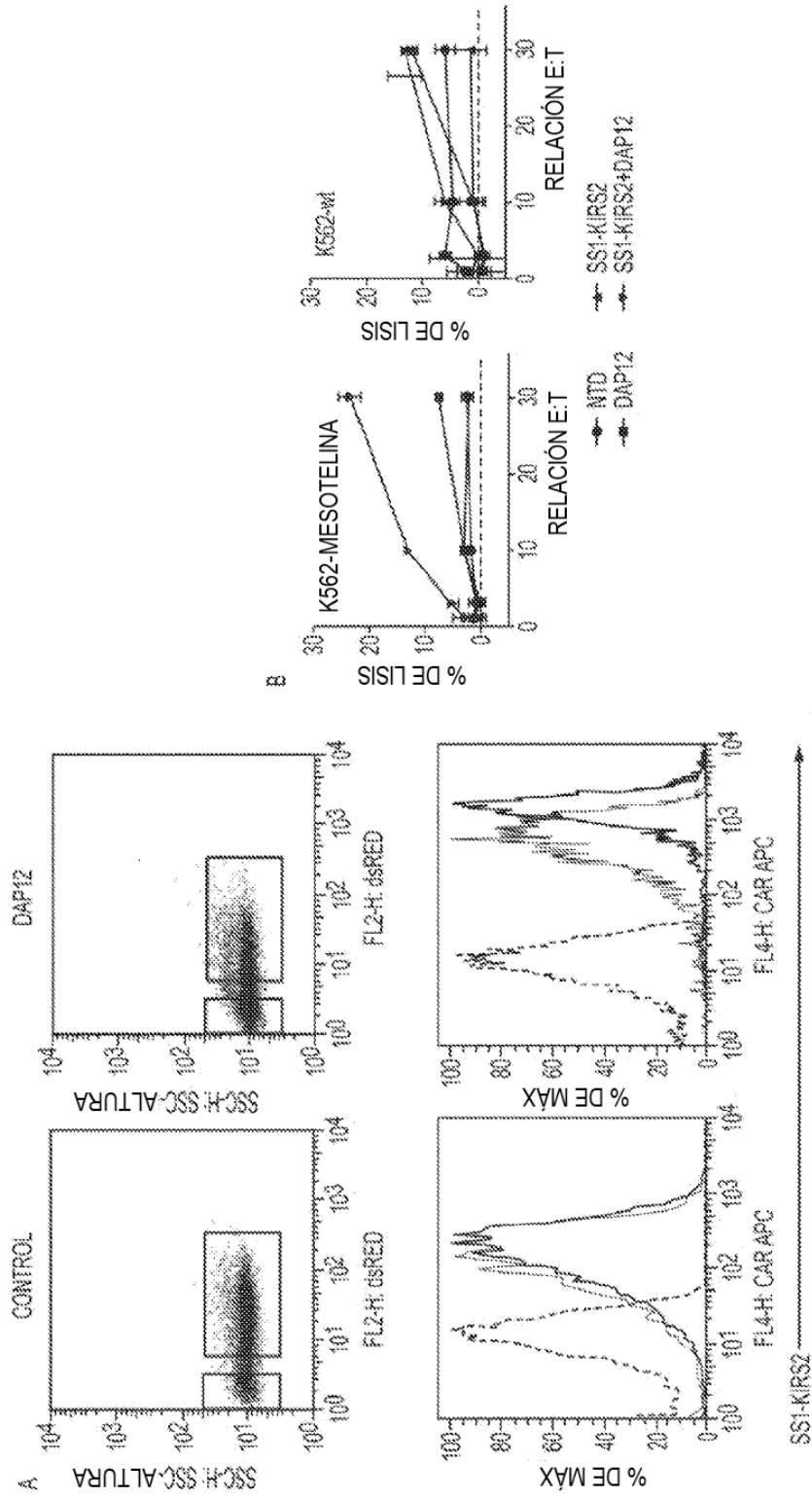


FIG. 12

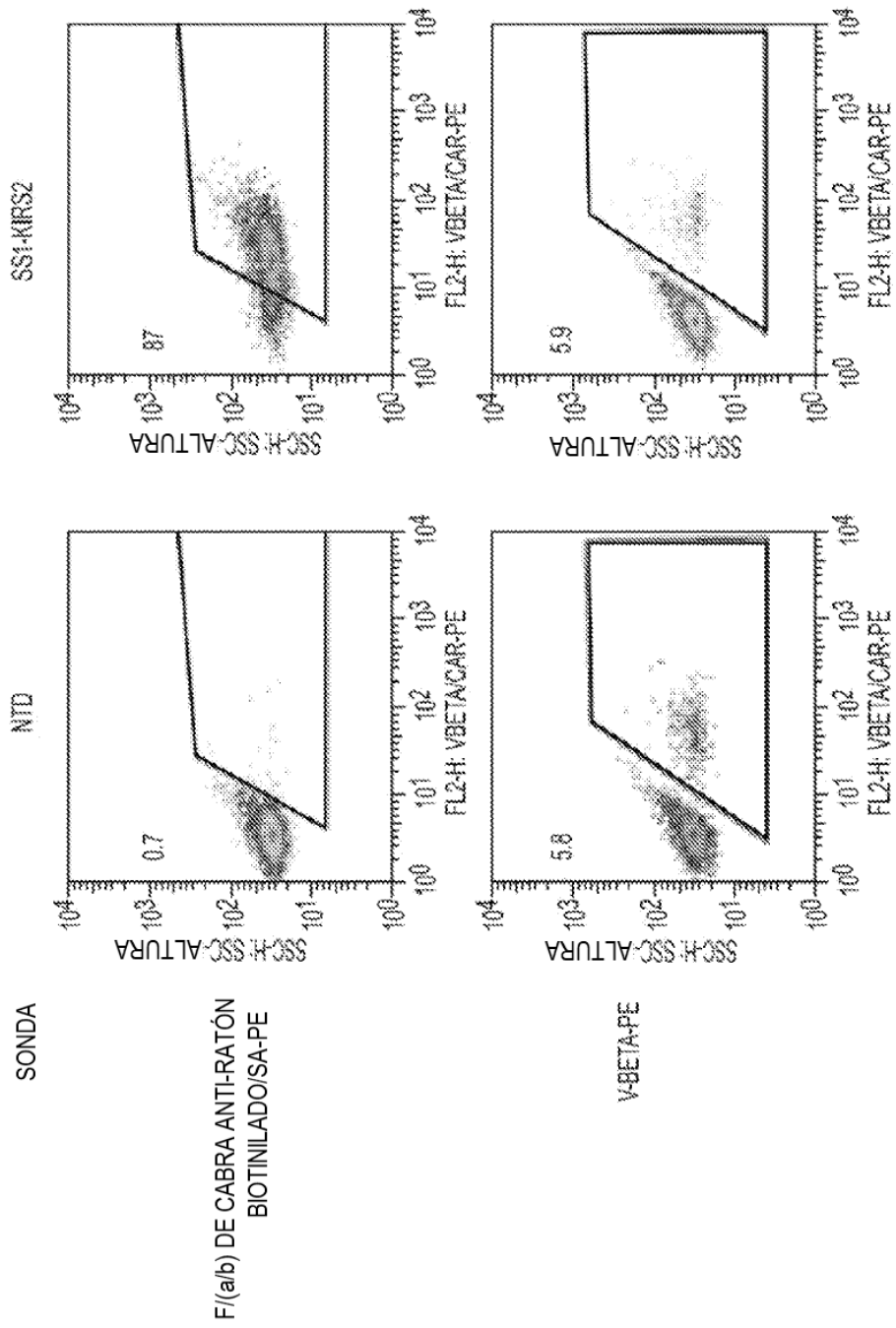


FIG. 13

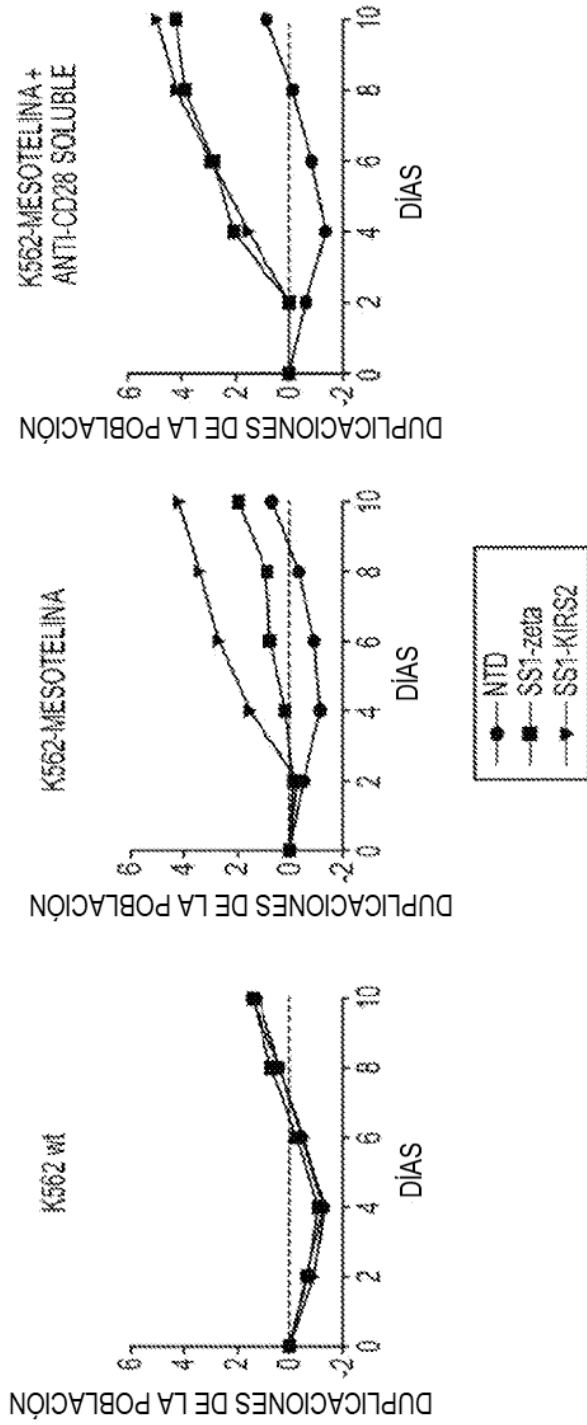


FIG. 14

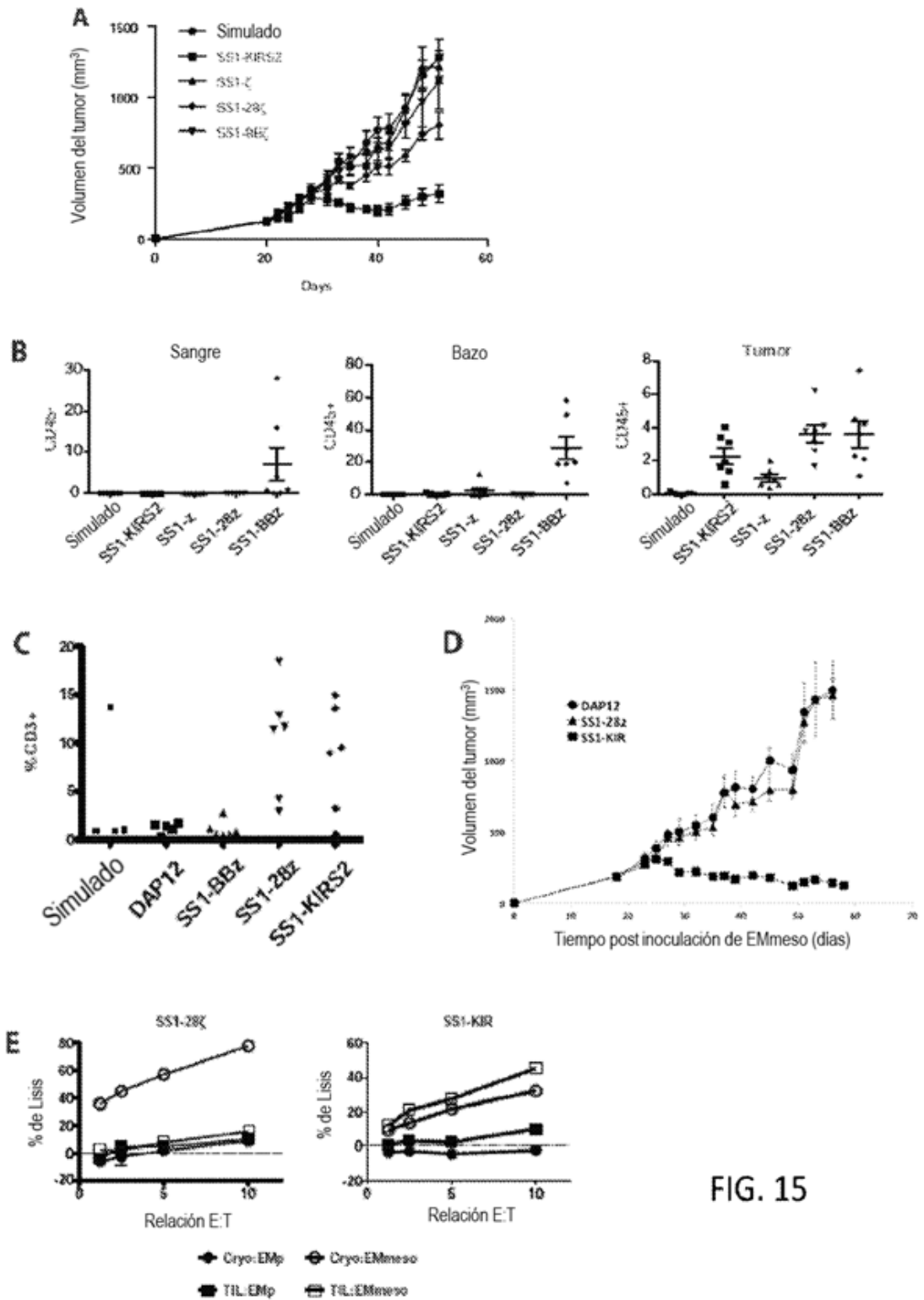


FIG. 15

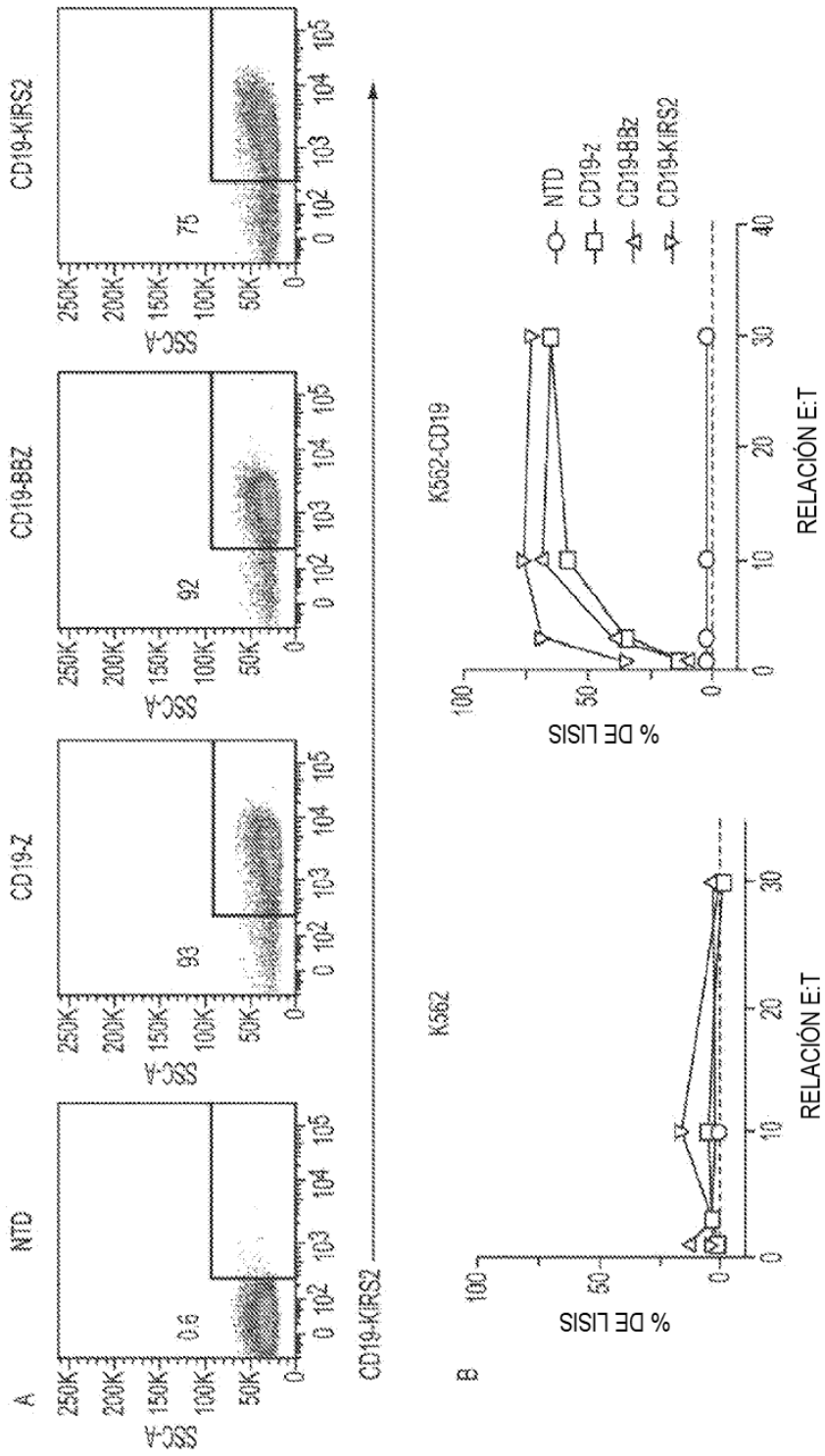


FIG. 16

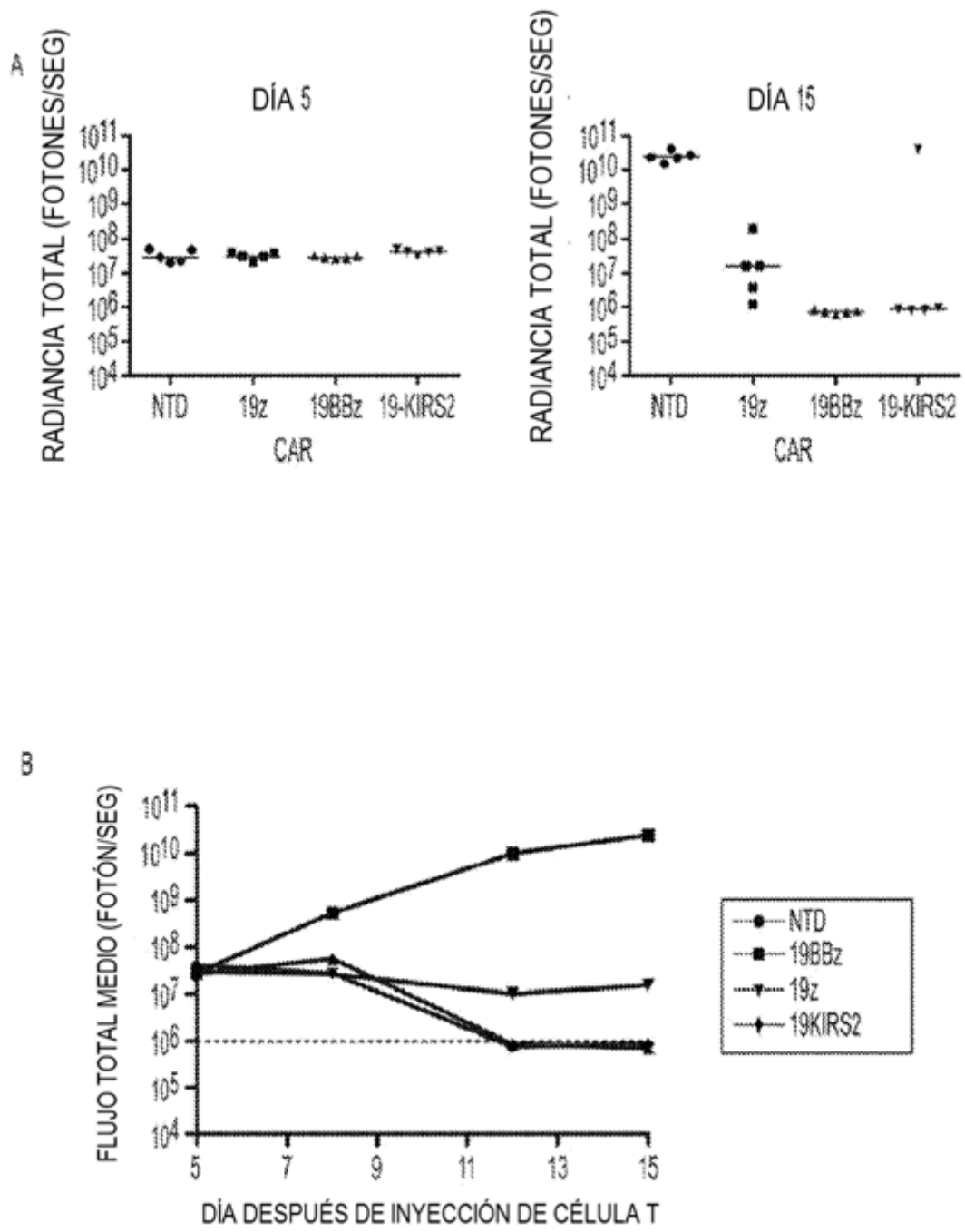


FIG. 17

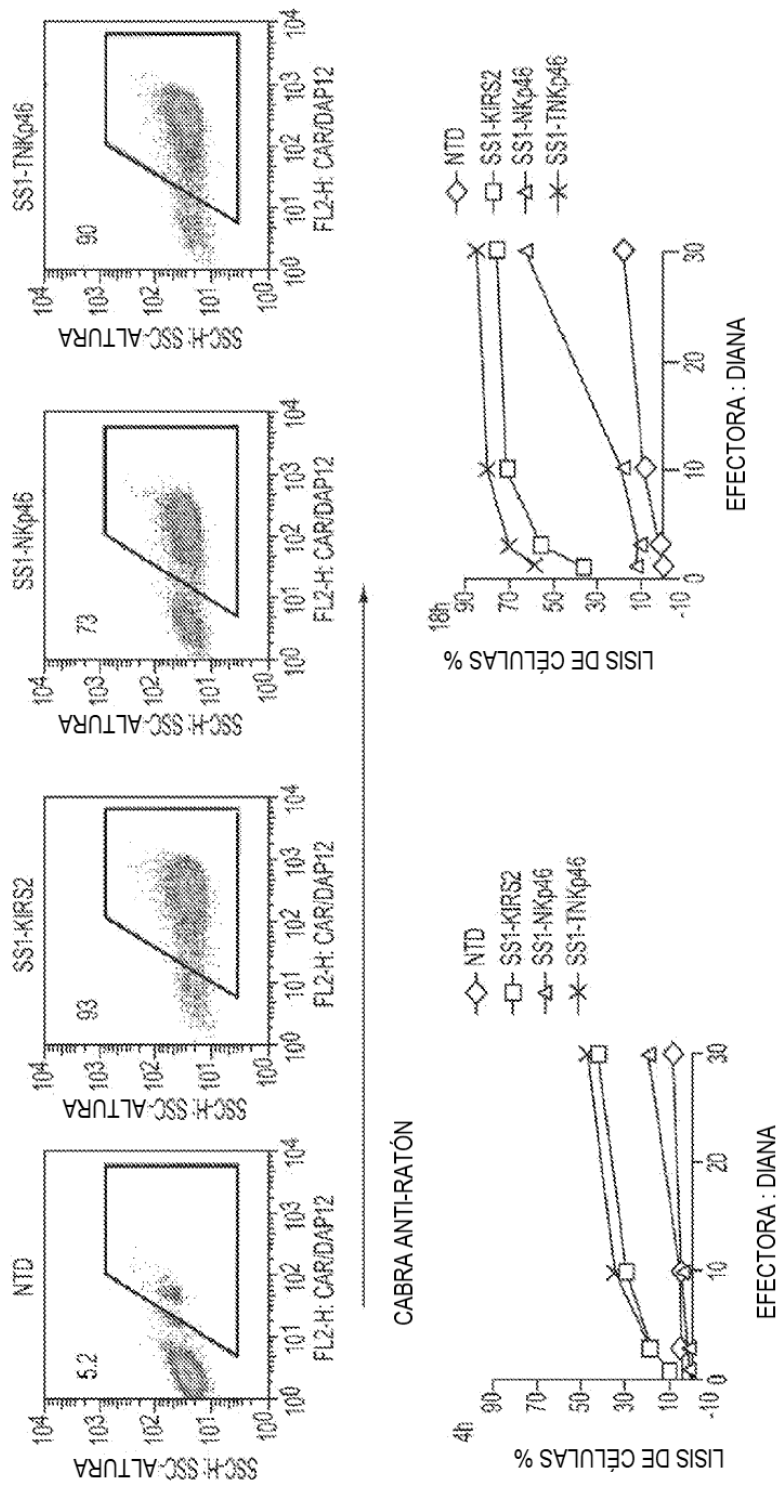
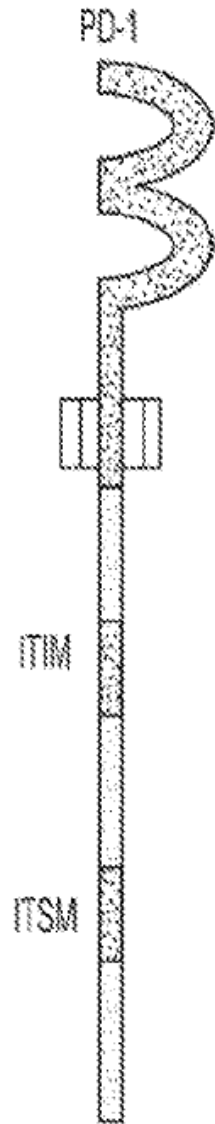


FIG. 18

TIPO SALVAJE



ACTIVADOR

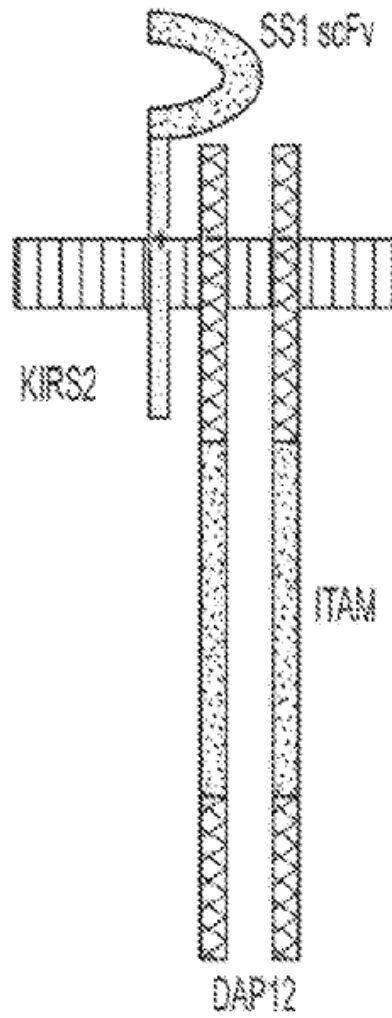


FIG. 19

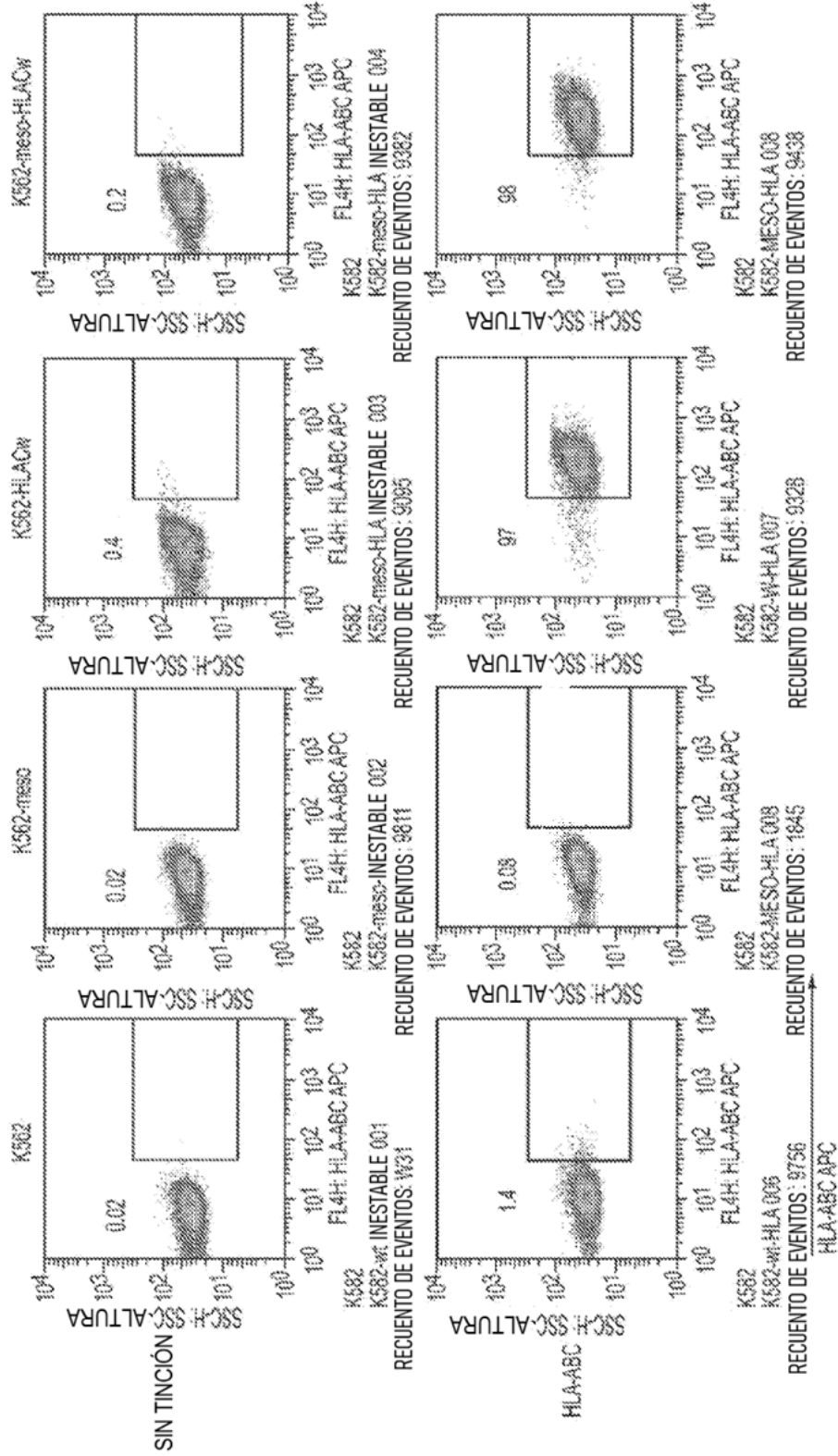


FIG. 20

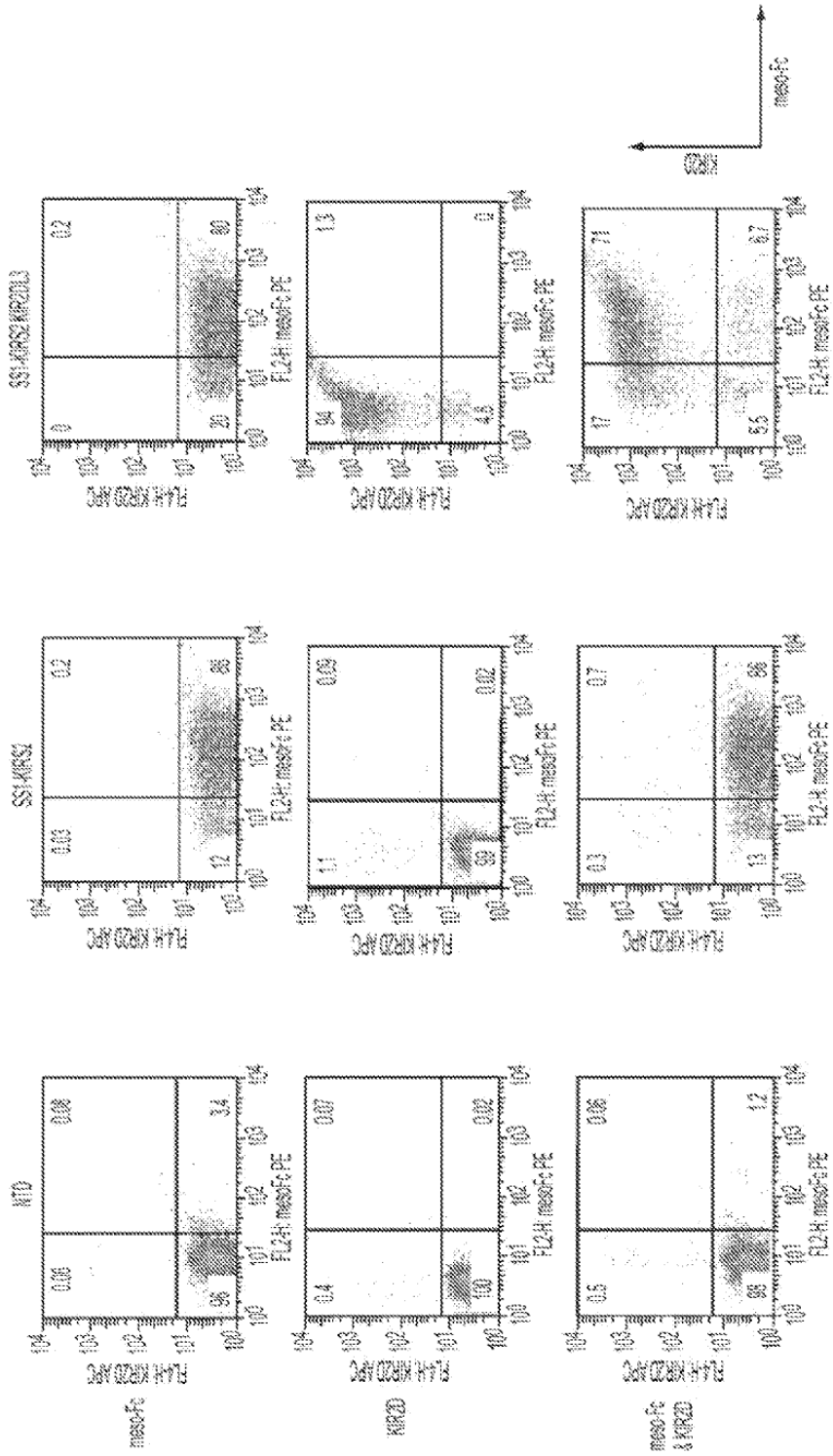


FIG. 21

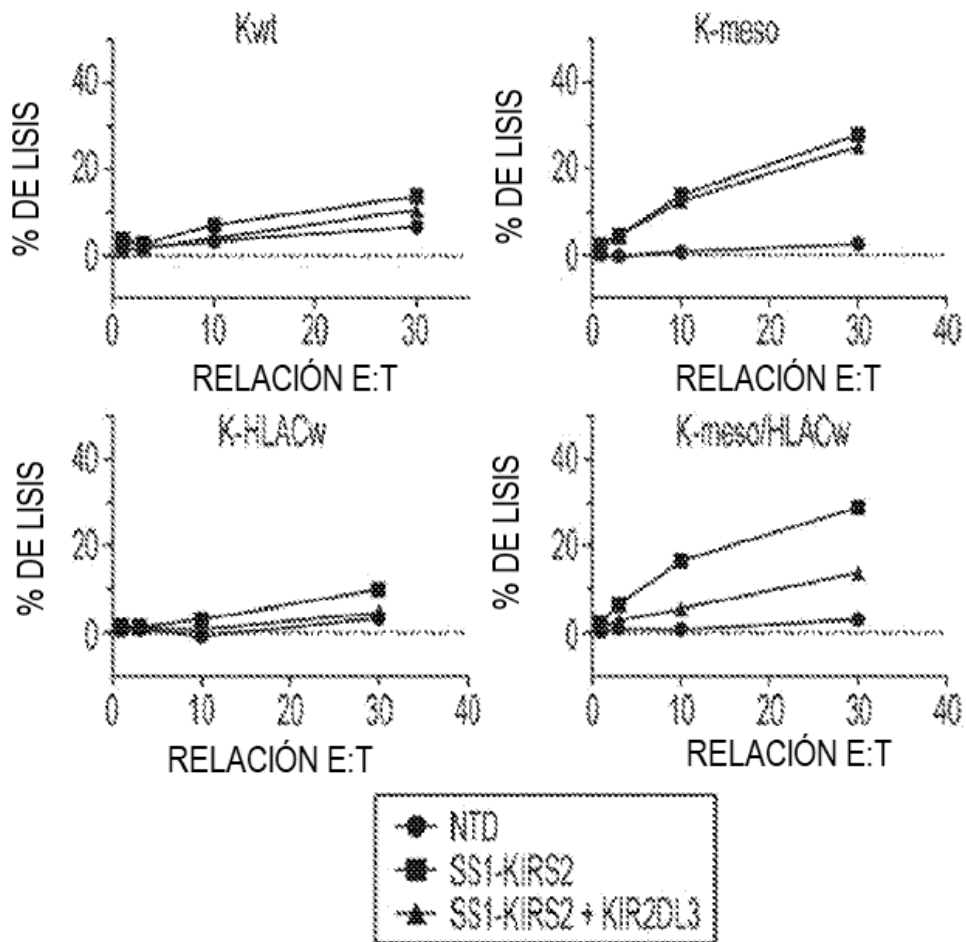


FIG. 22

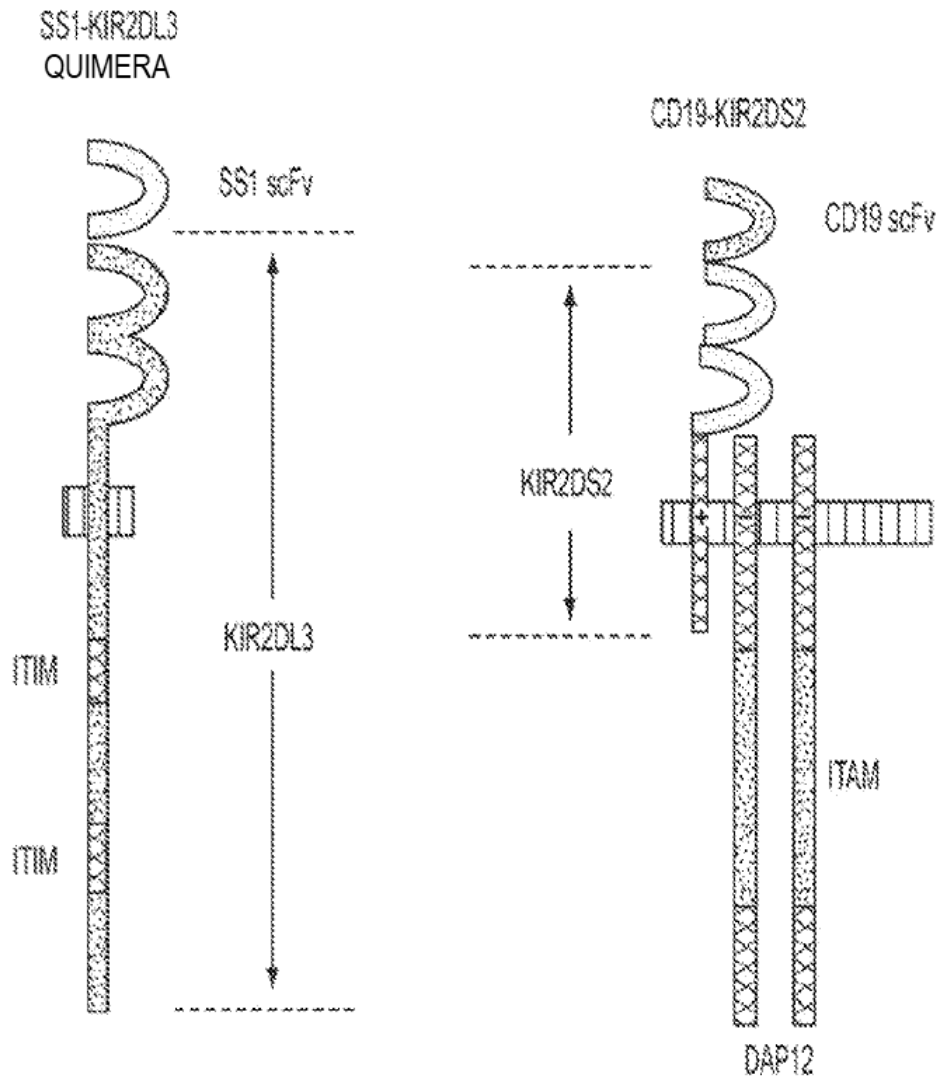


FIG. 23

DILUCIÓN DE VECTOR LENTIVIRAL CD19-KIR2DS2

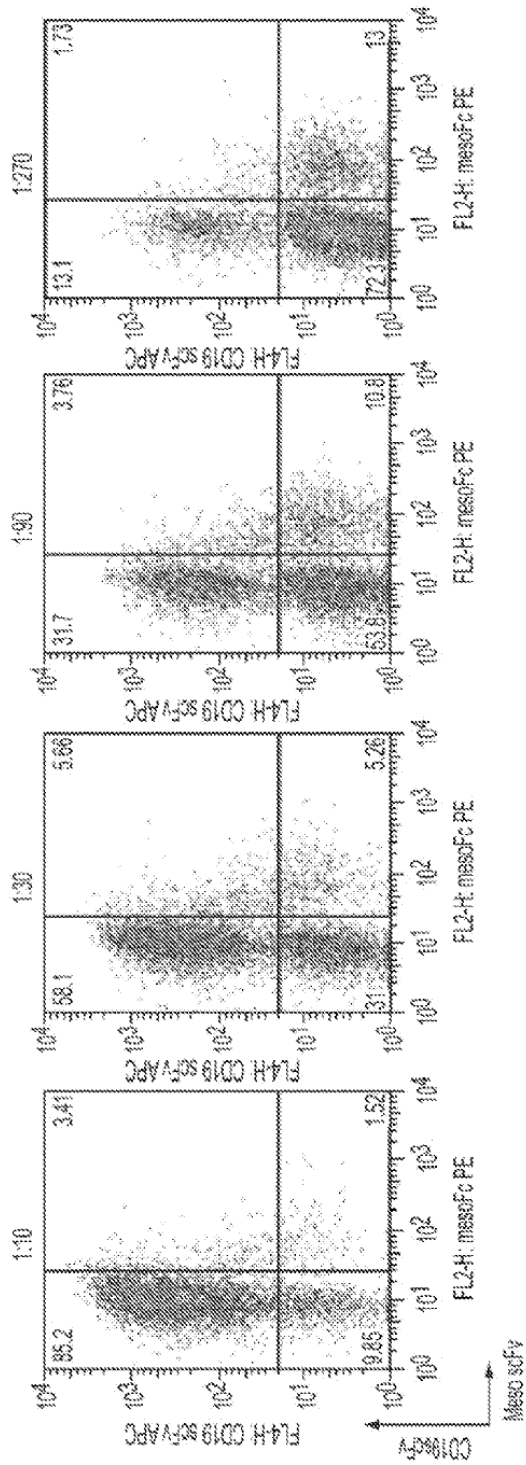


FIG. 24

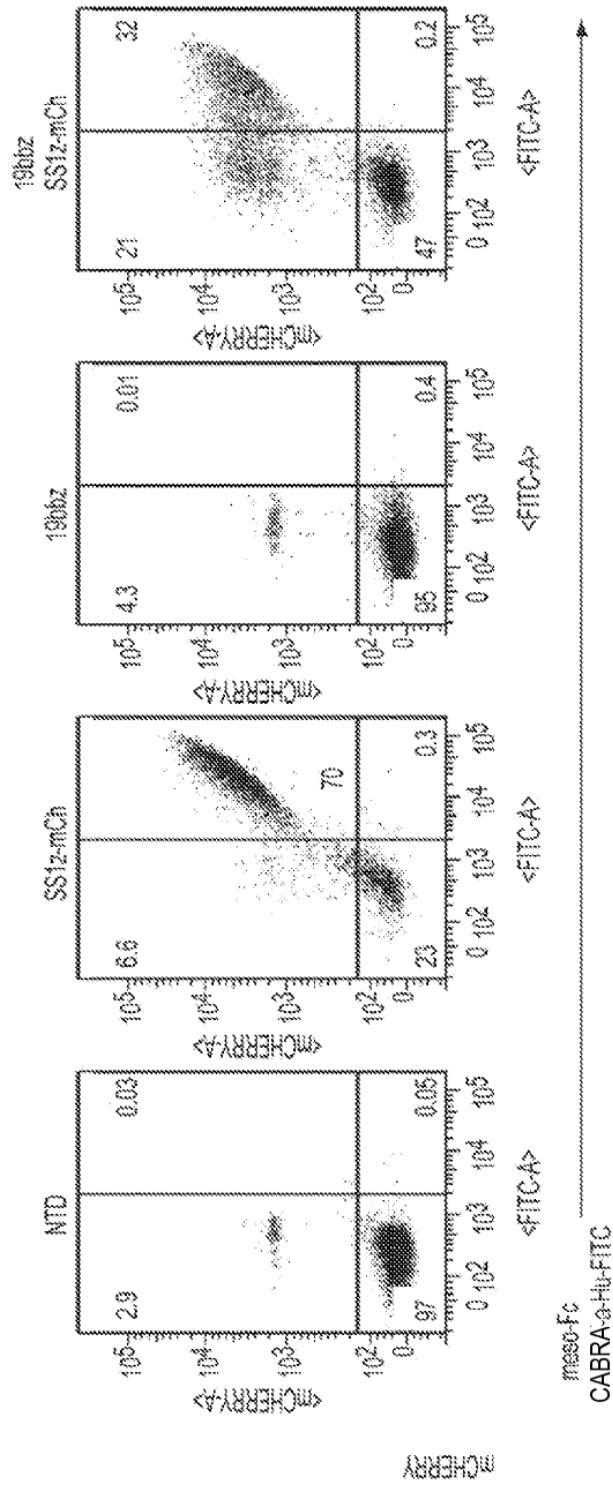


FIG. 25

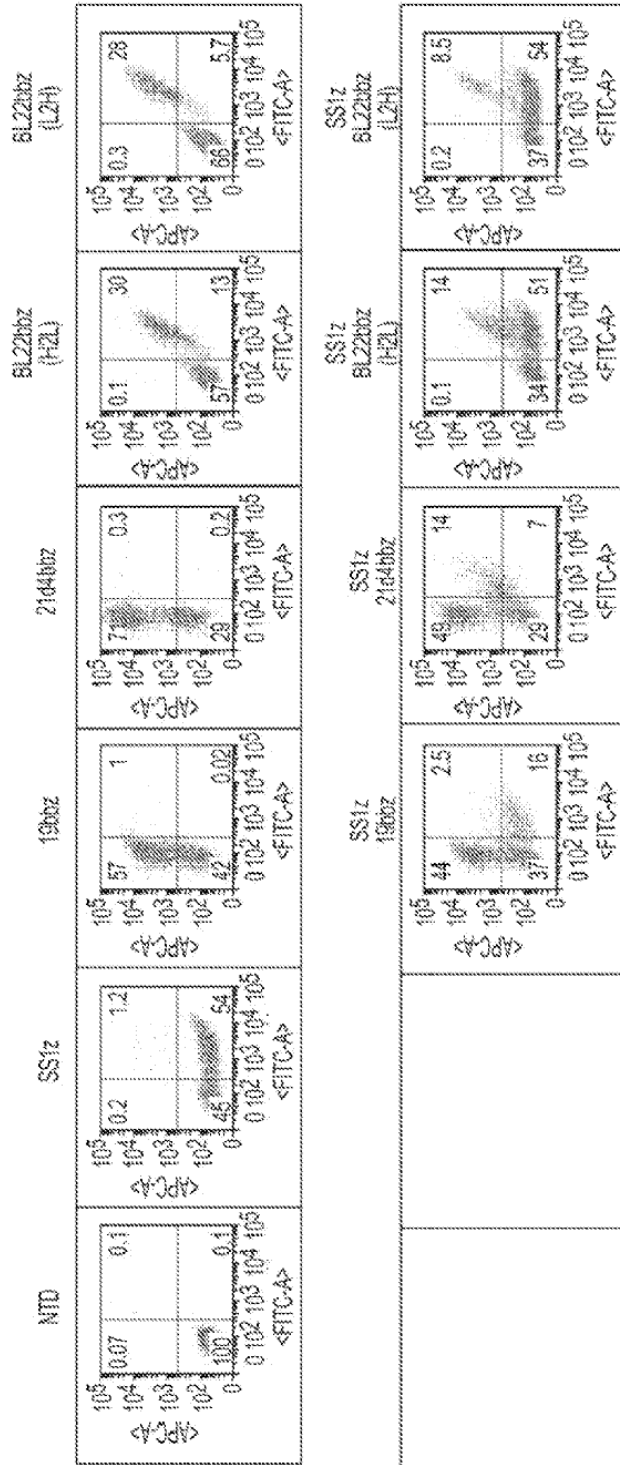


FIG. 26

BIOTINA-PROTEINAL -> SA-APC

meso-Fc -> GAH-Fc-FITC

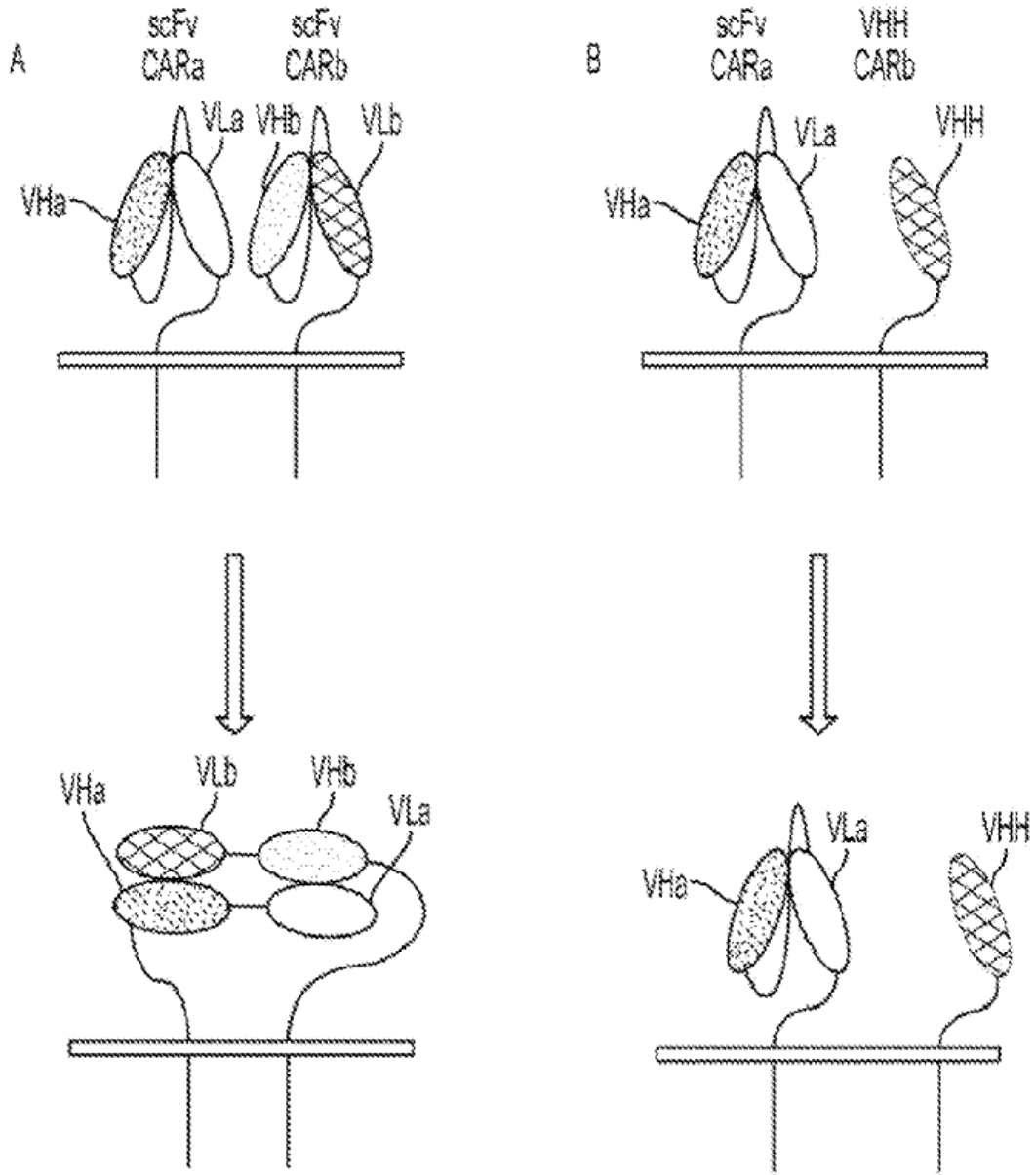


FIG. 27

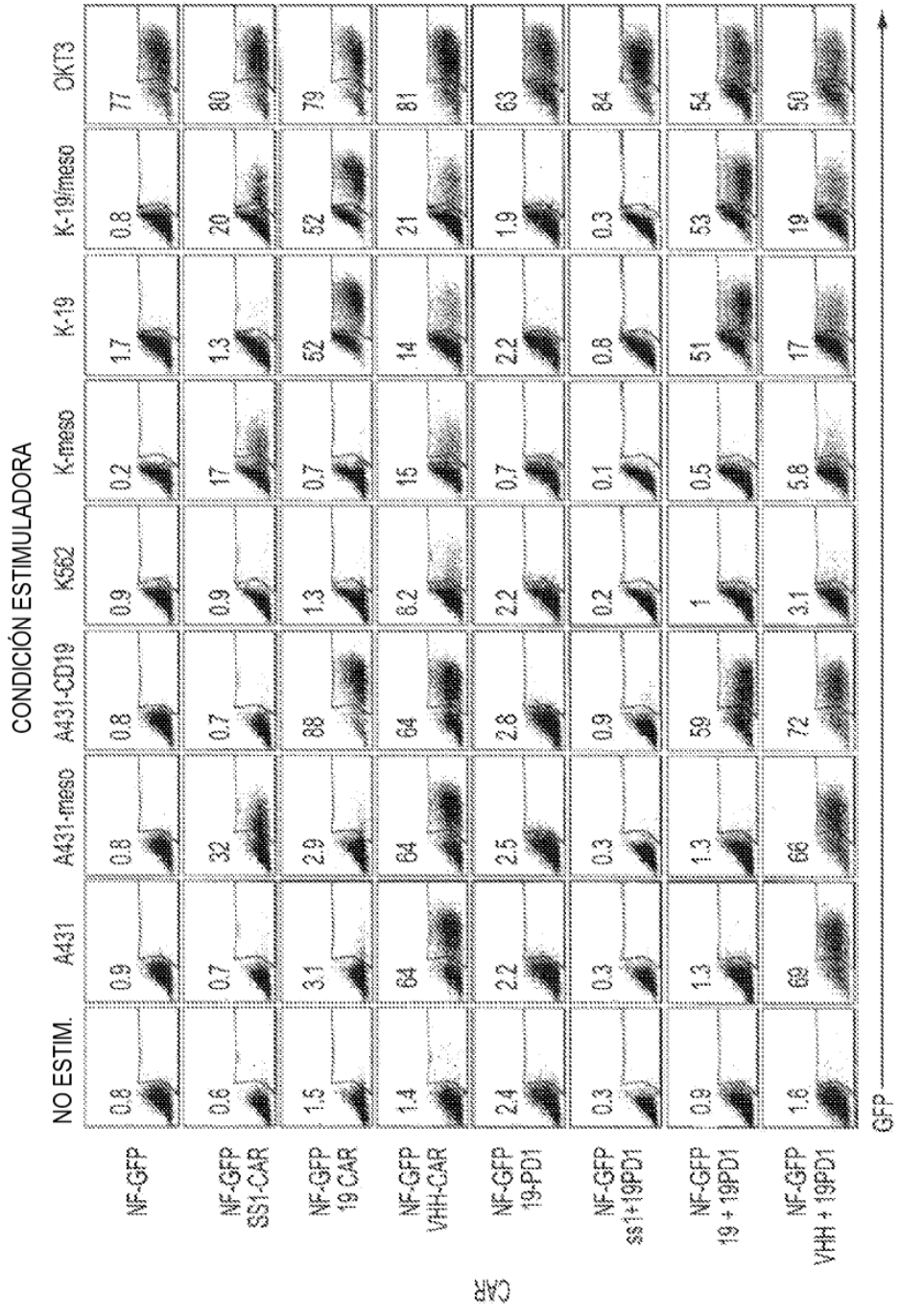


FIG. 28

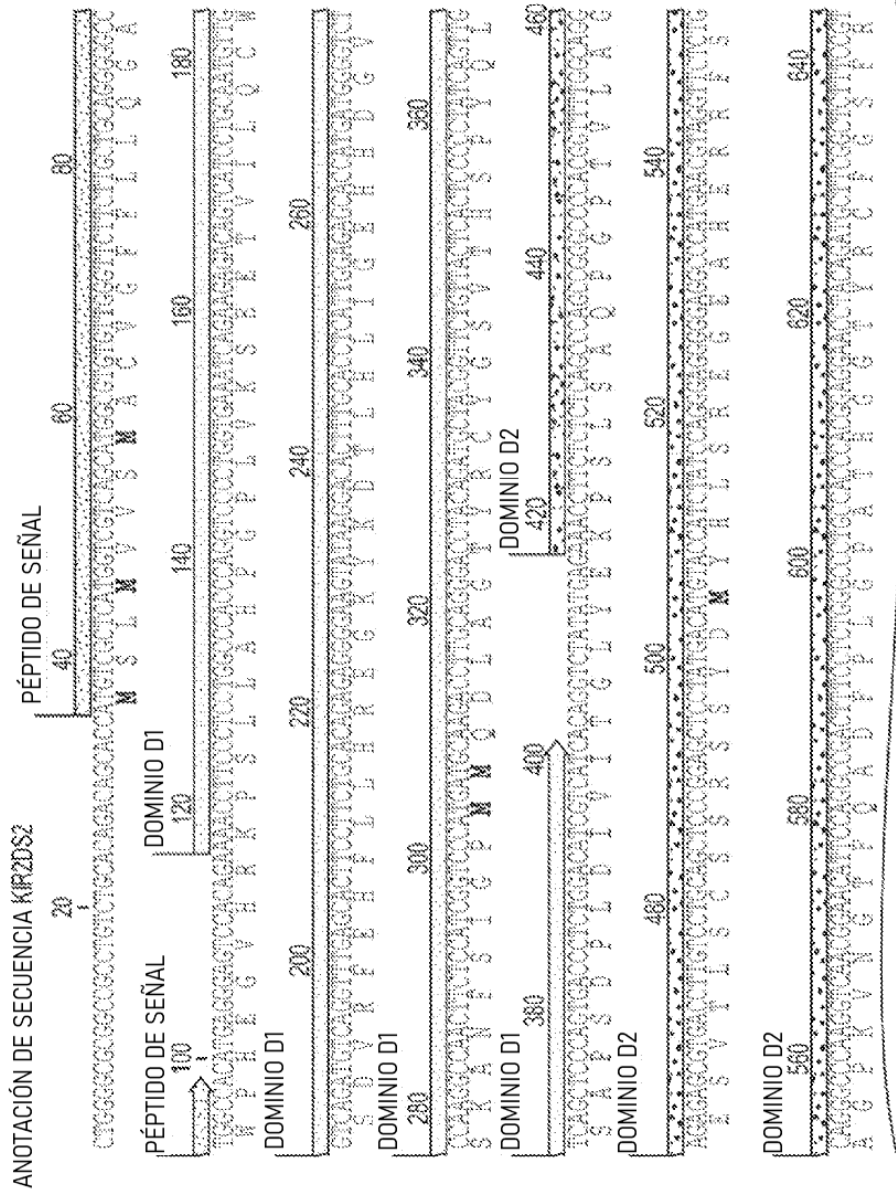


FIG. 29

ANOTACIÓN DE SECUENCIA SS1-KIRS2

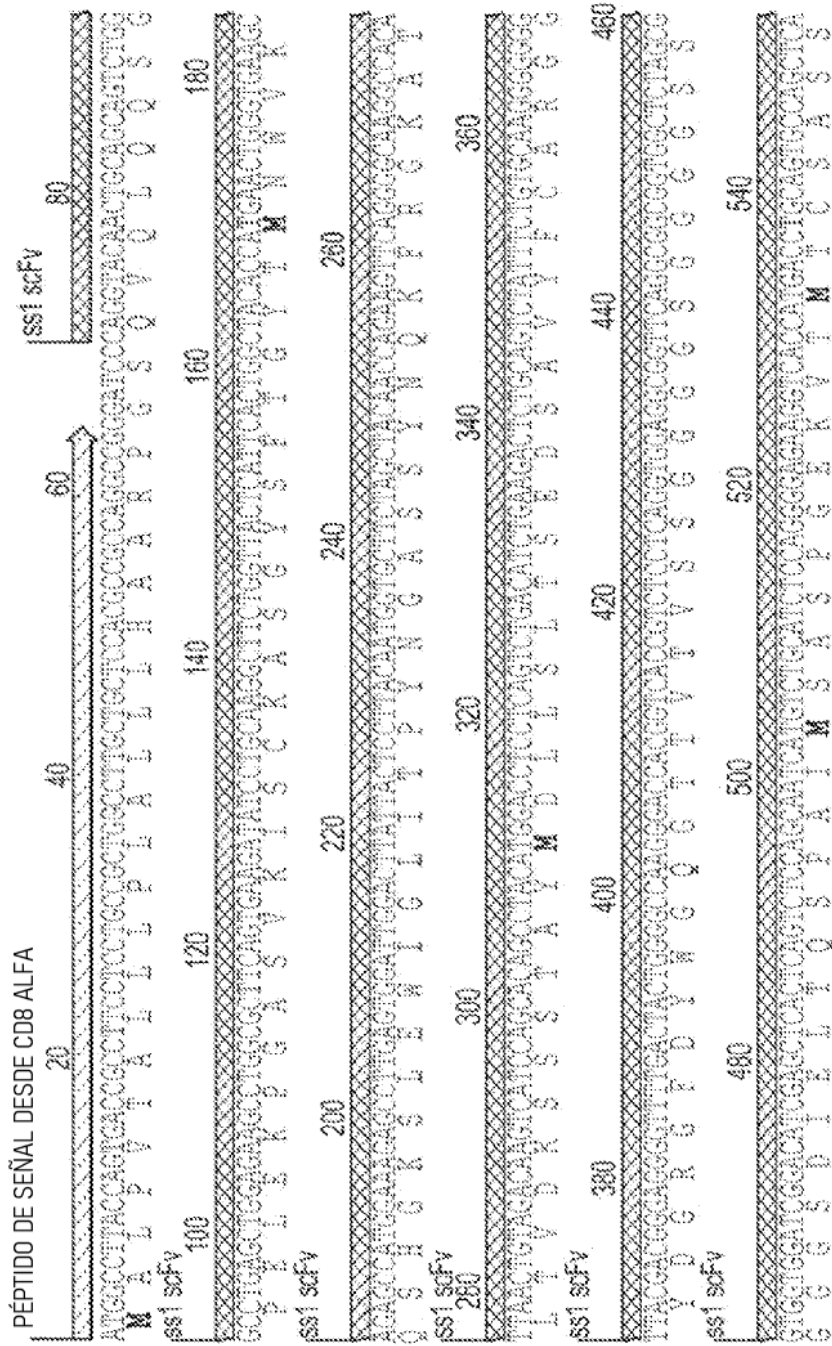


FIG. 32

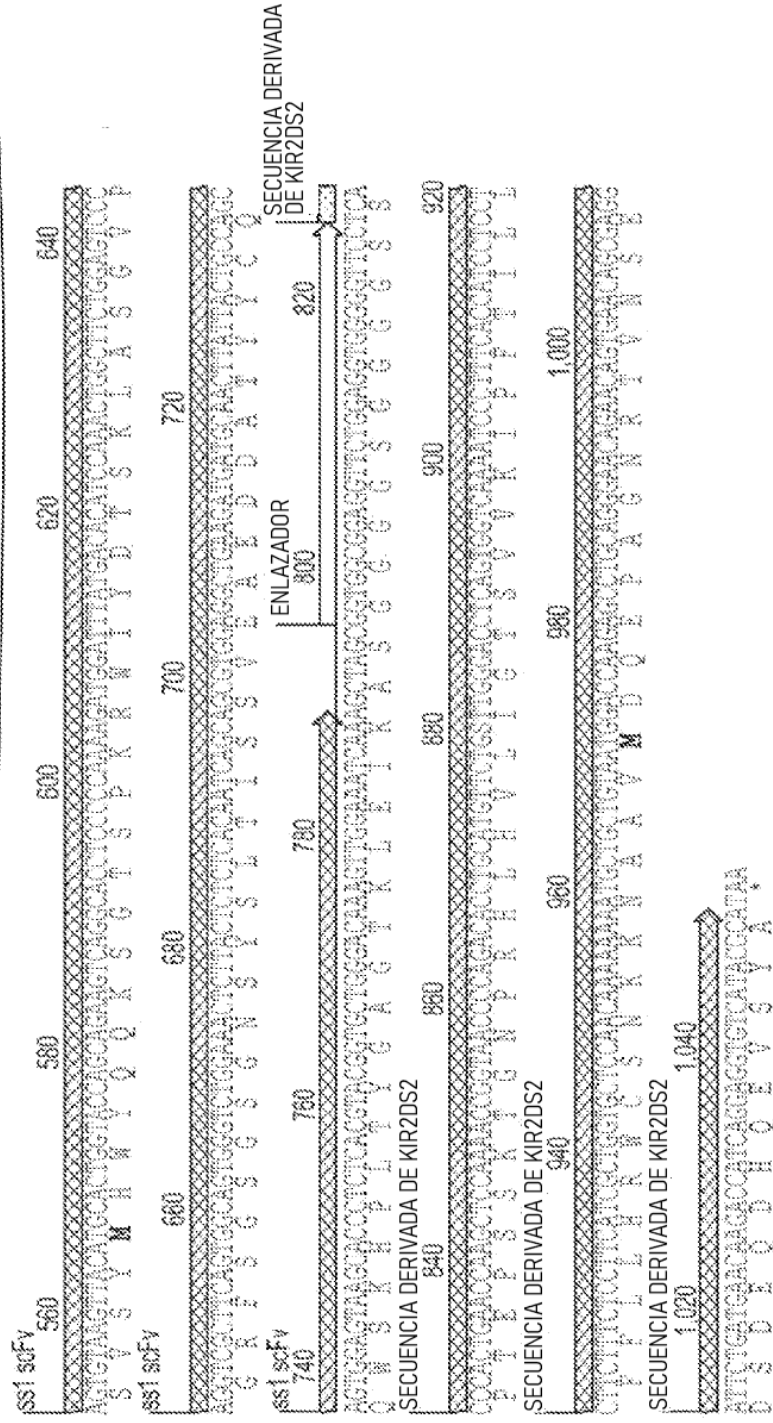


FIG. 32
CONTINUACIÓN

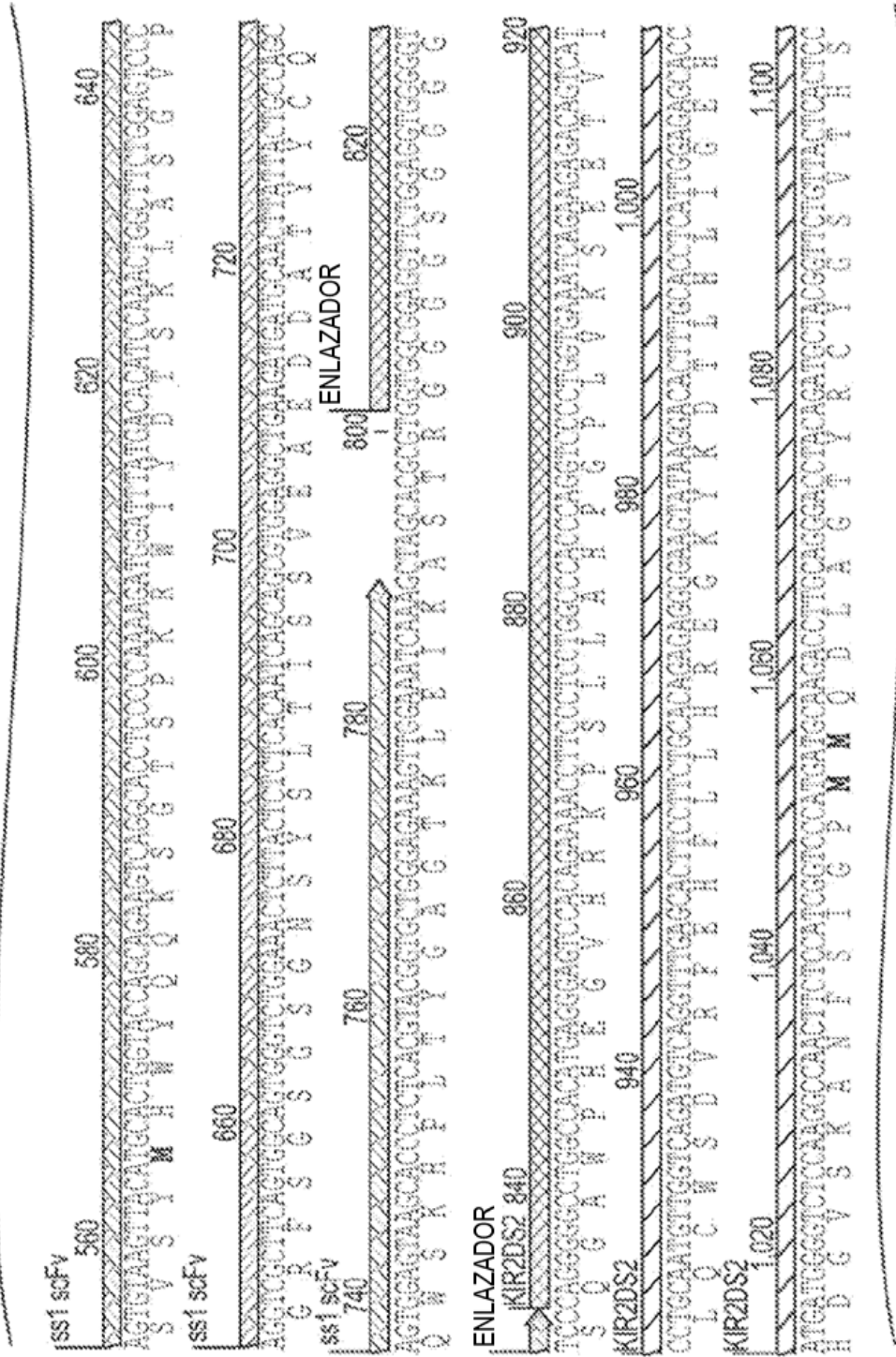


FIG. 33
CONTINUACIÓN

ANOTACIÓN DE SECUENCIA SS1-INKp46

PEPTIDO DE SEÑAL DESDE CD8 ALFA

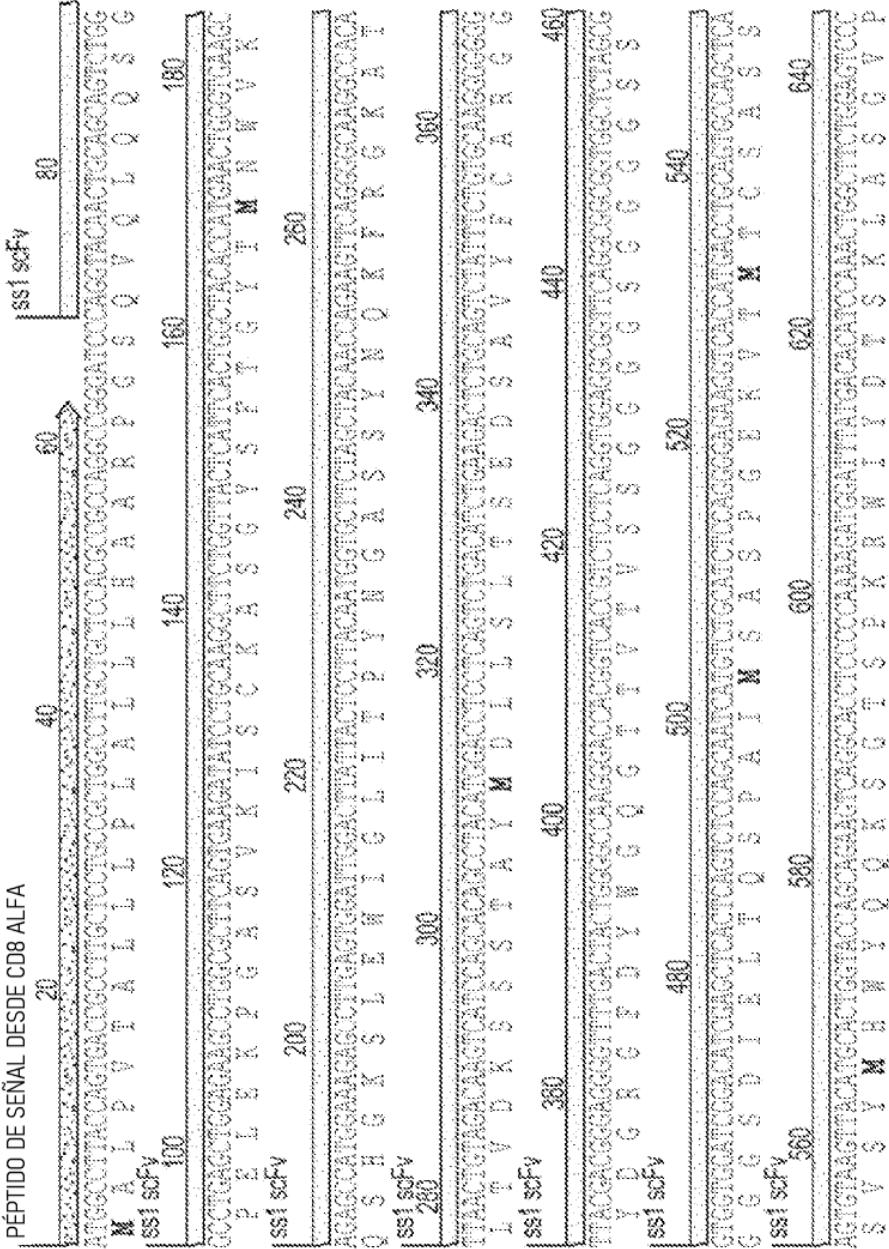


FIG. 34

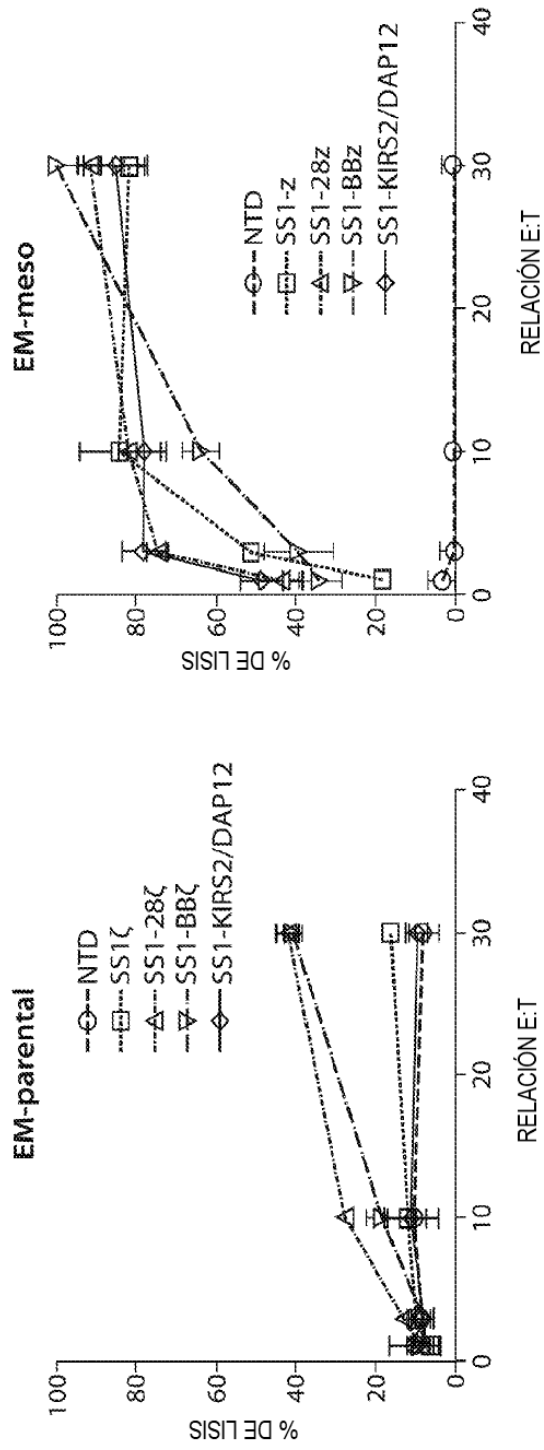


FIG. 36

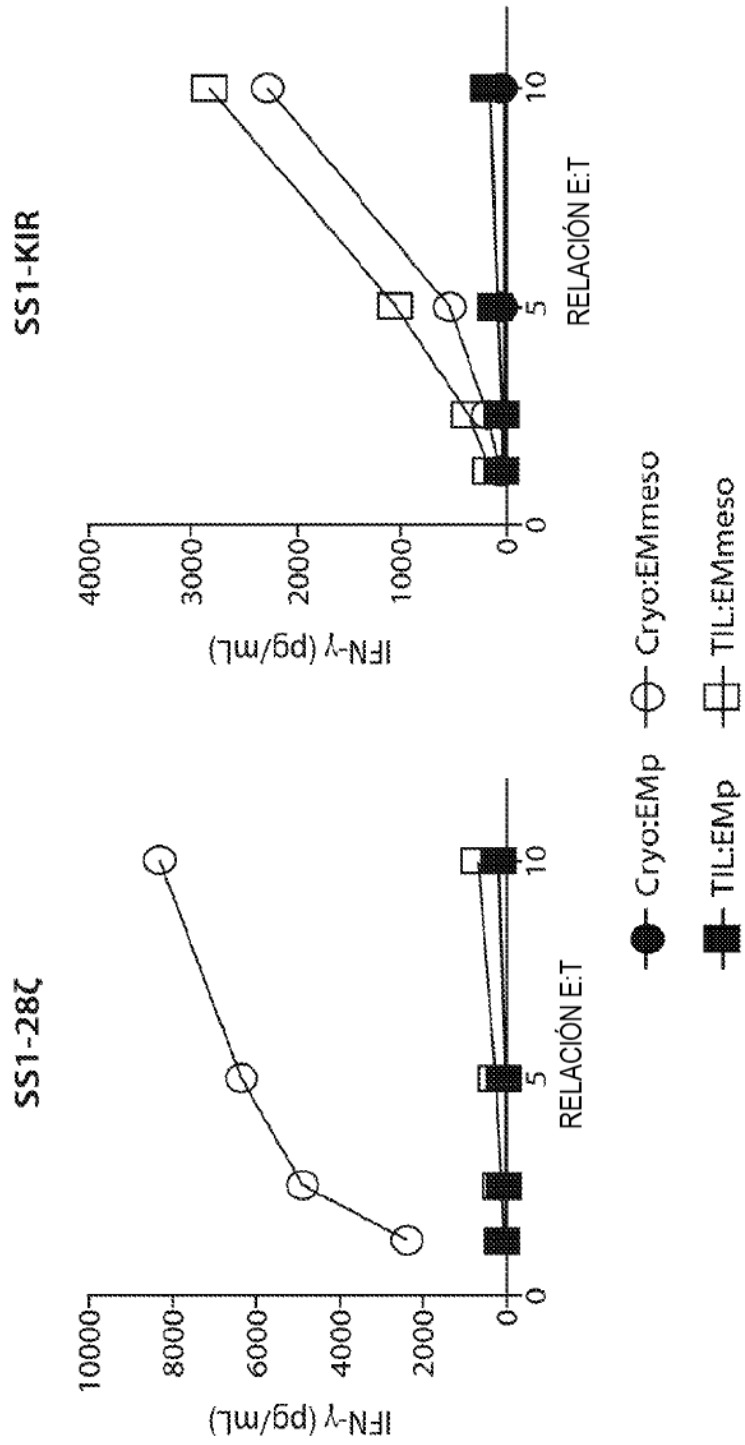


FIG. 37

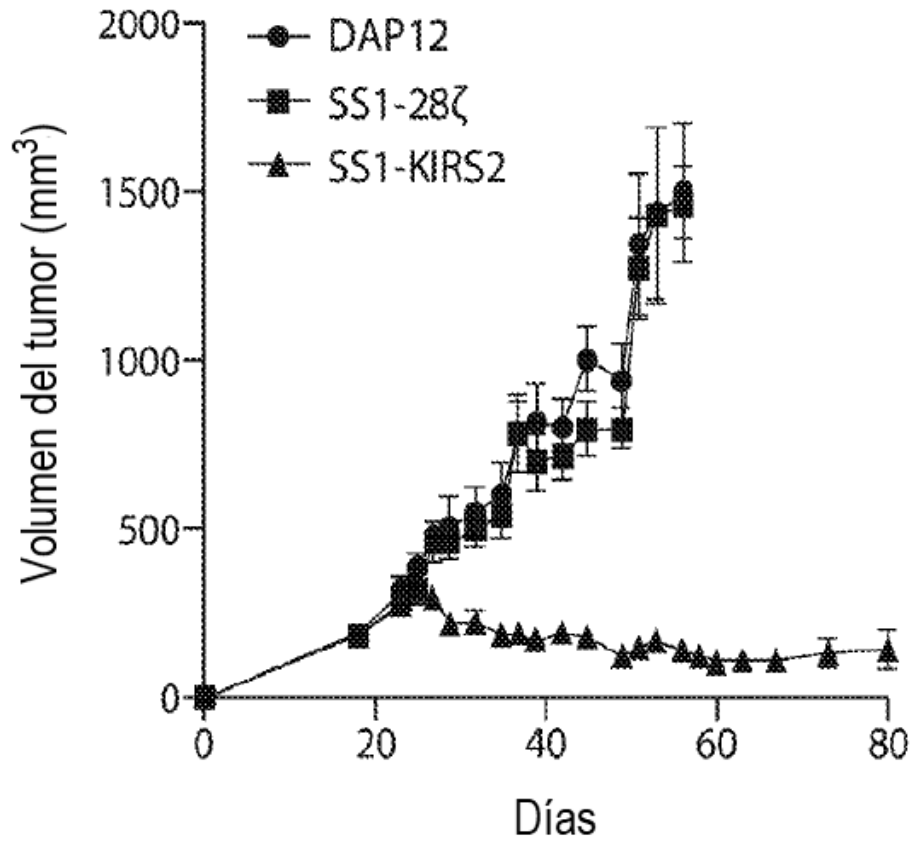


FIG. 38

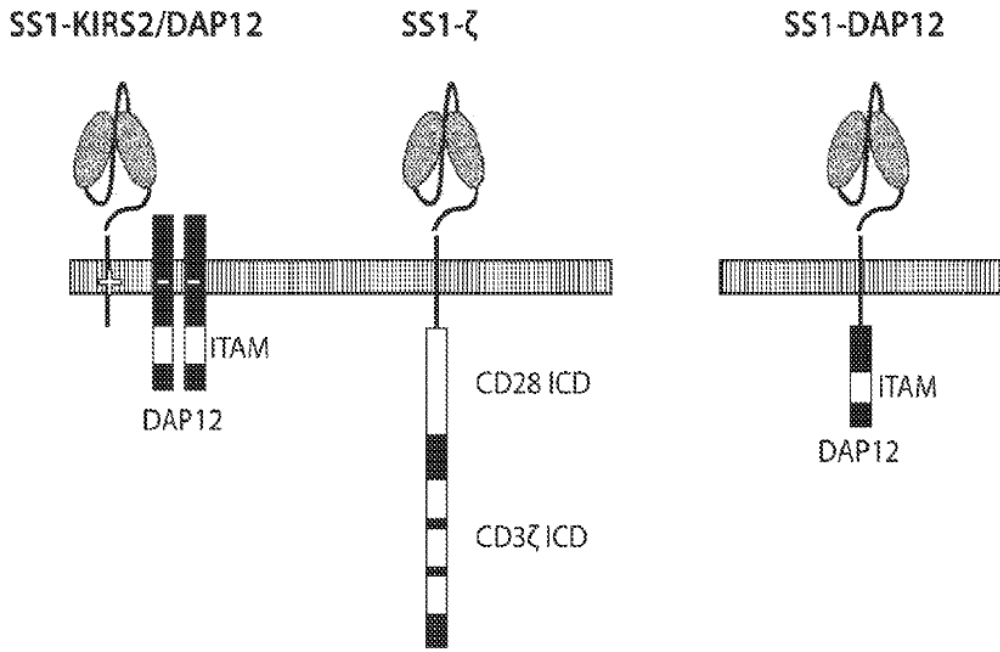


FIG. 39

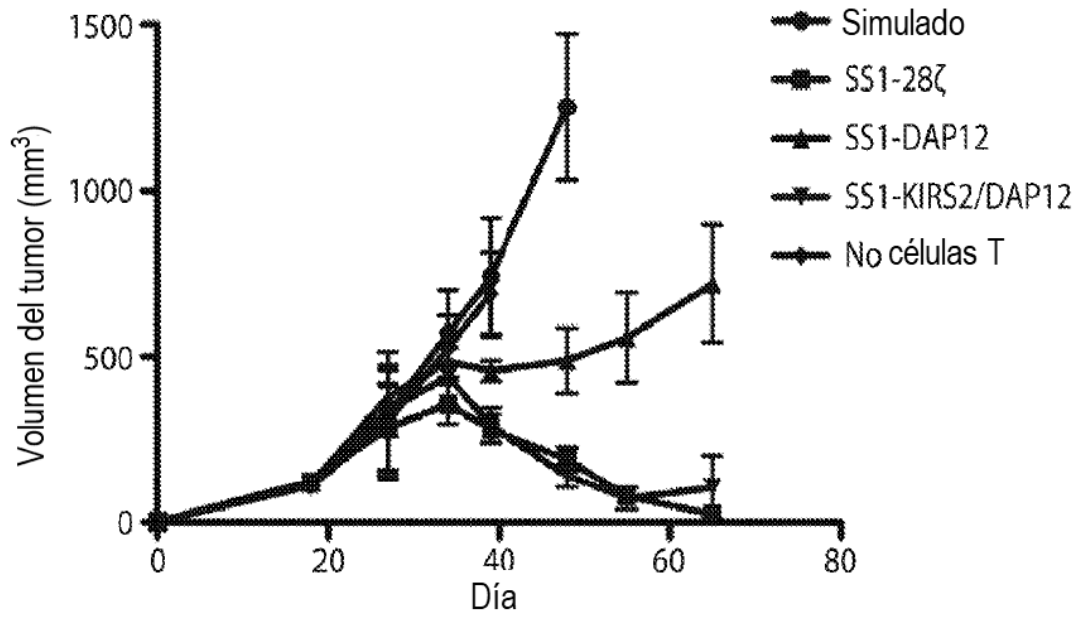


FIG. 40

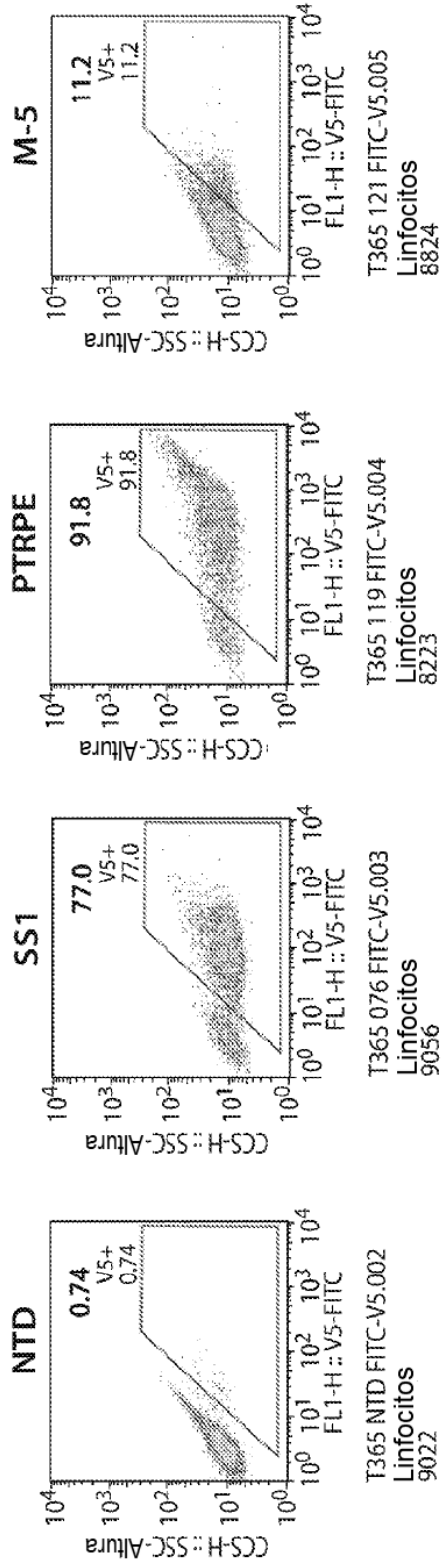


FIG. 41-1

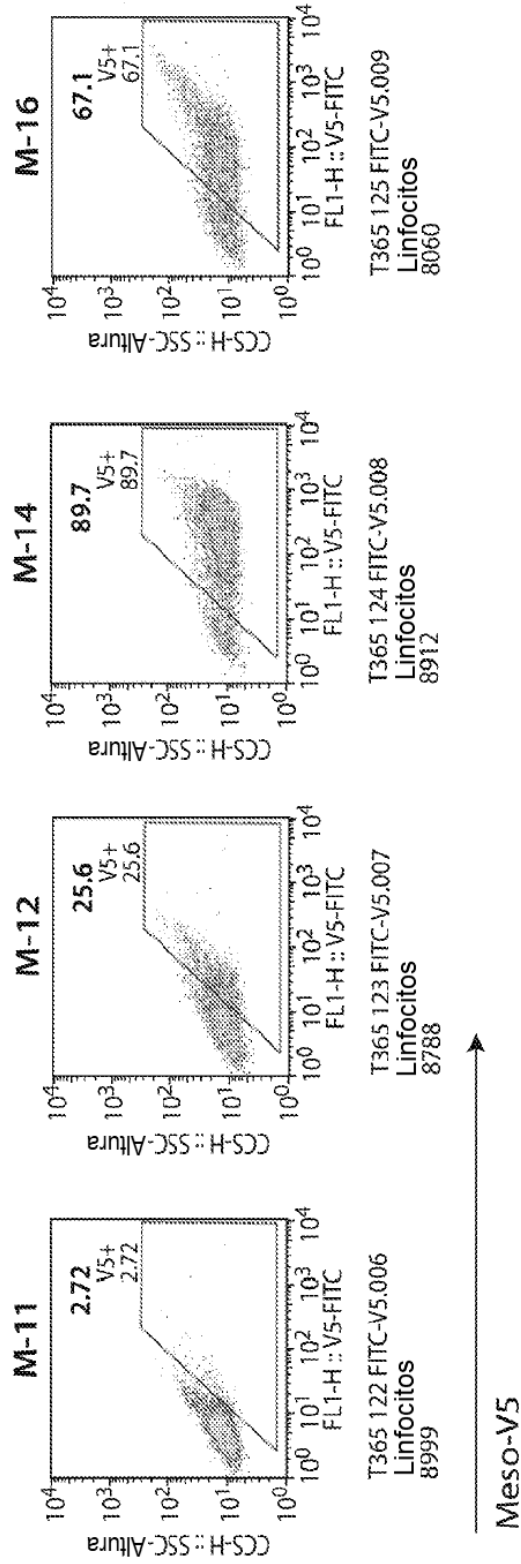


FIG. 41-2

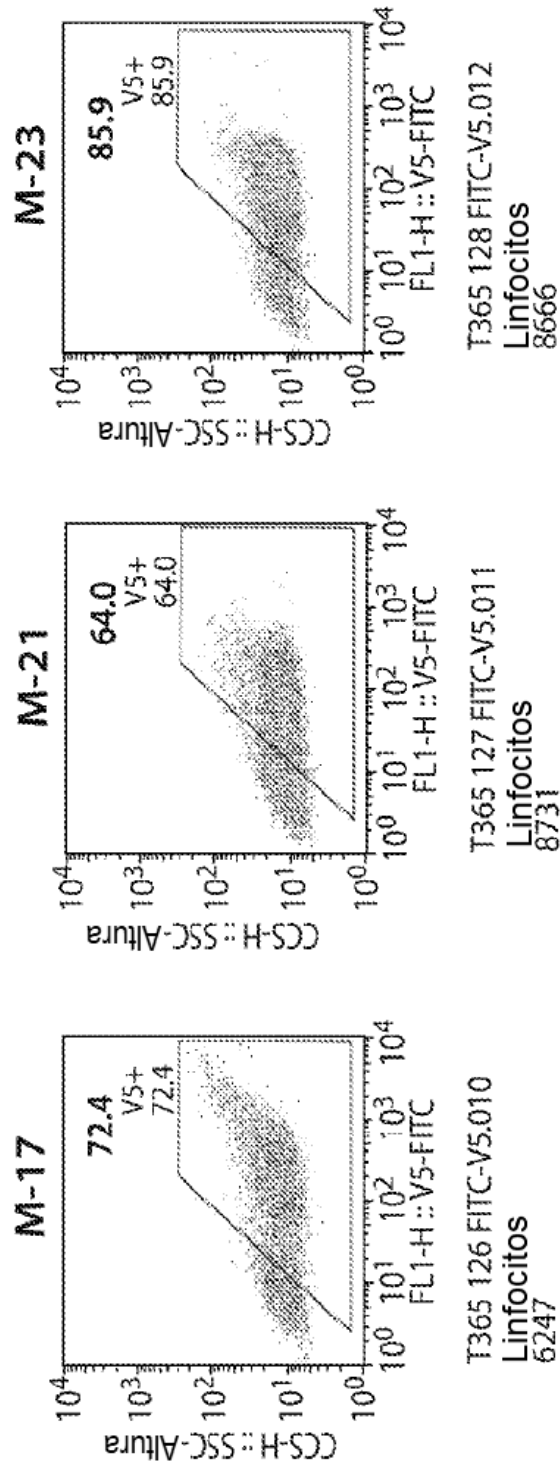
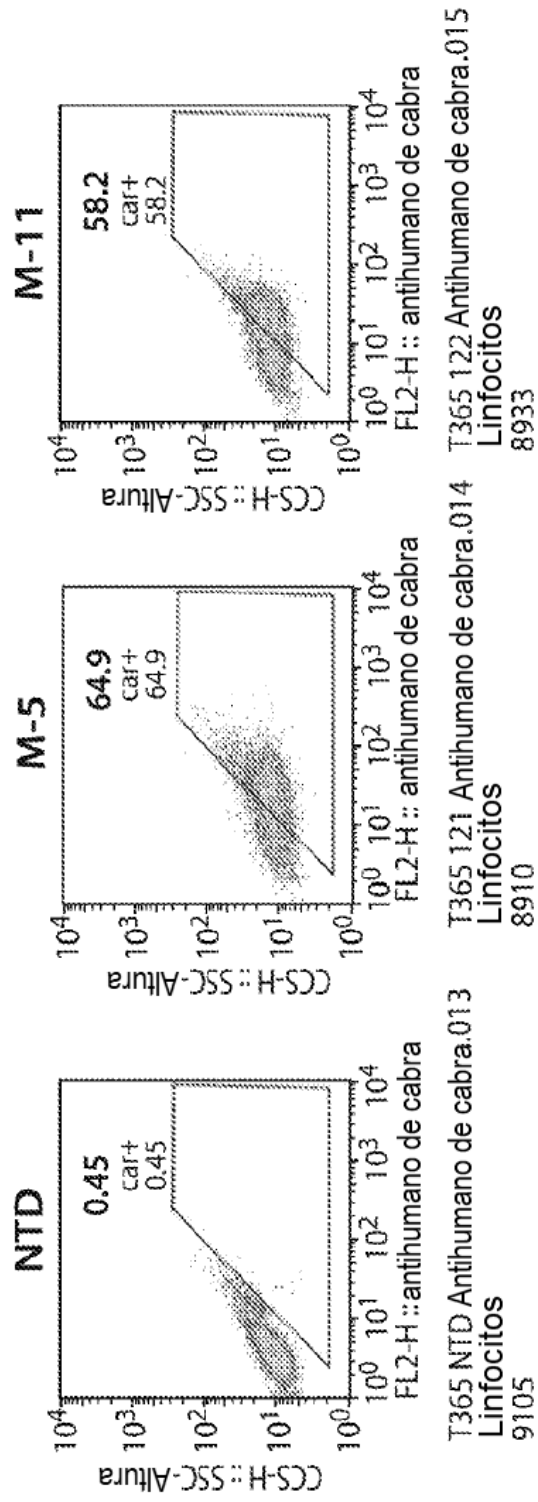


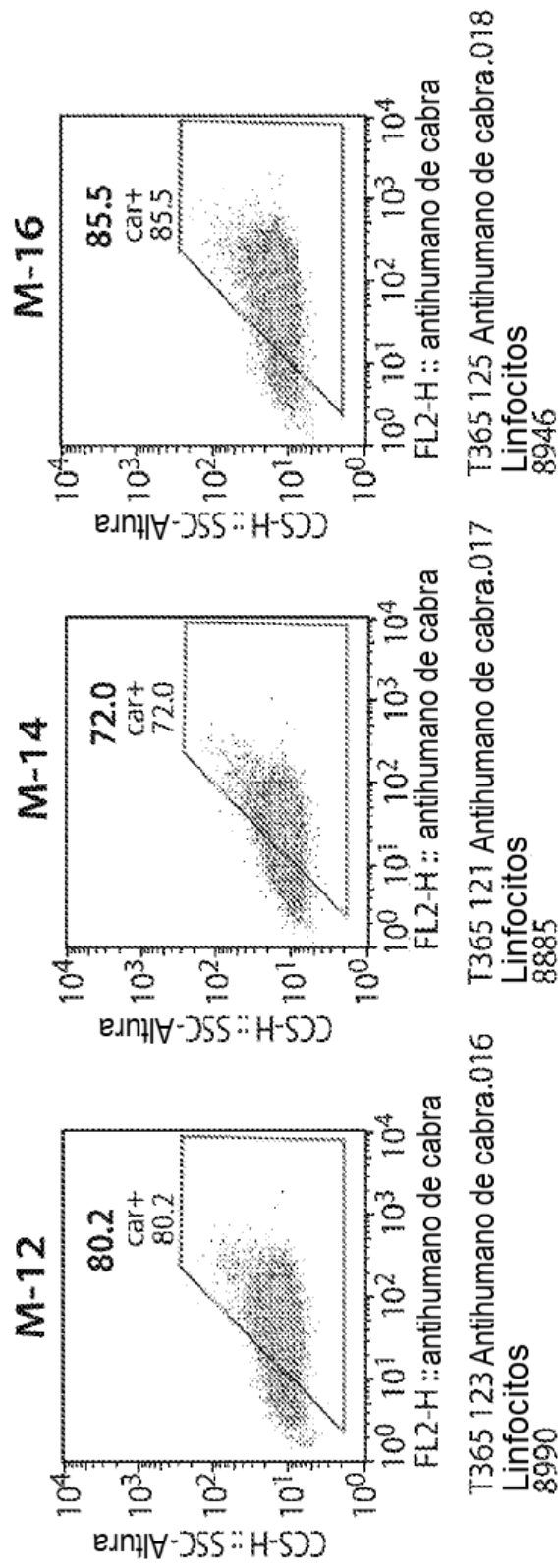
FIG. 41-3

Meso-V5



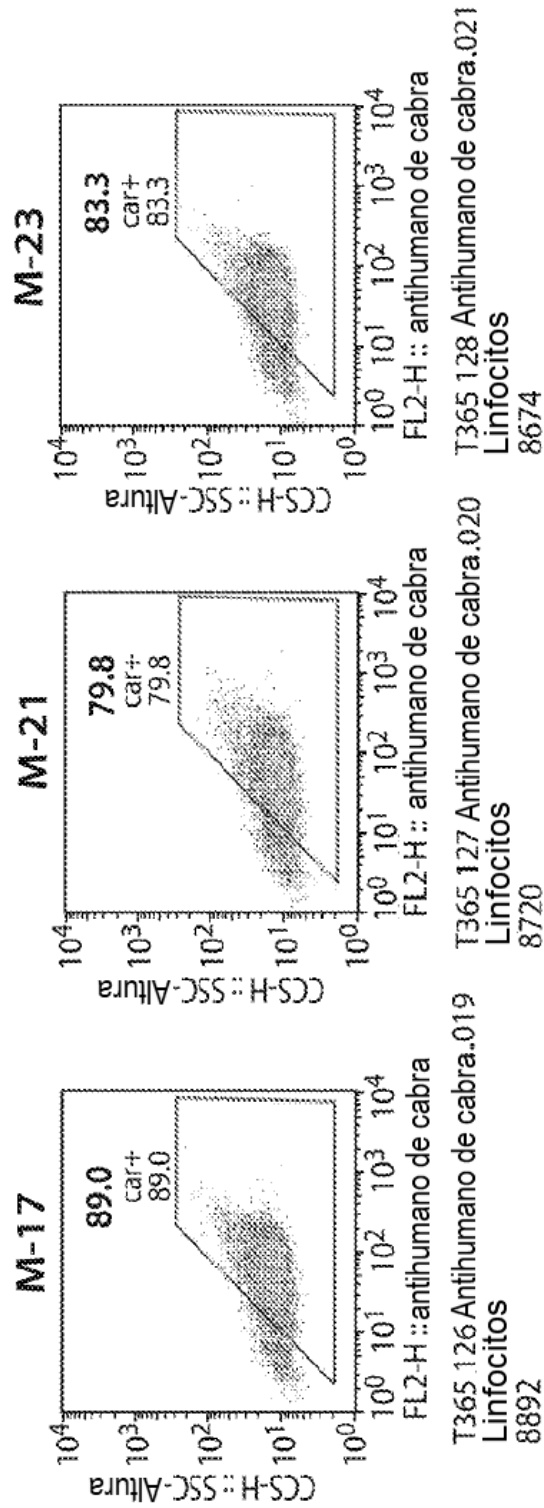
Antihumano de cabra

FIG. 41-4



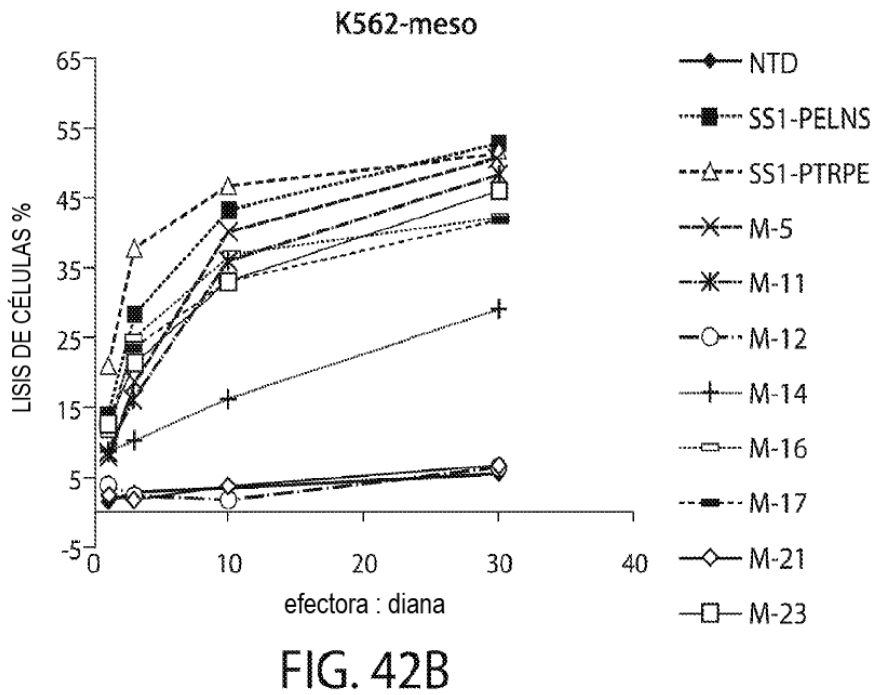
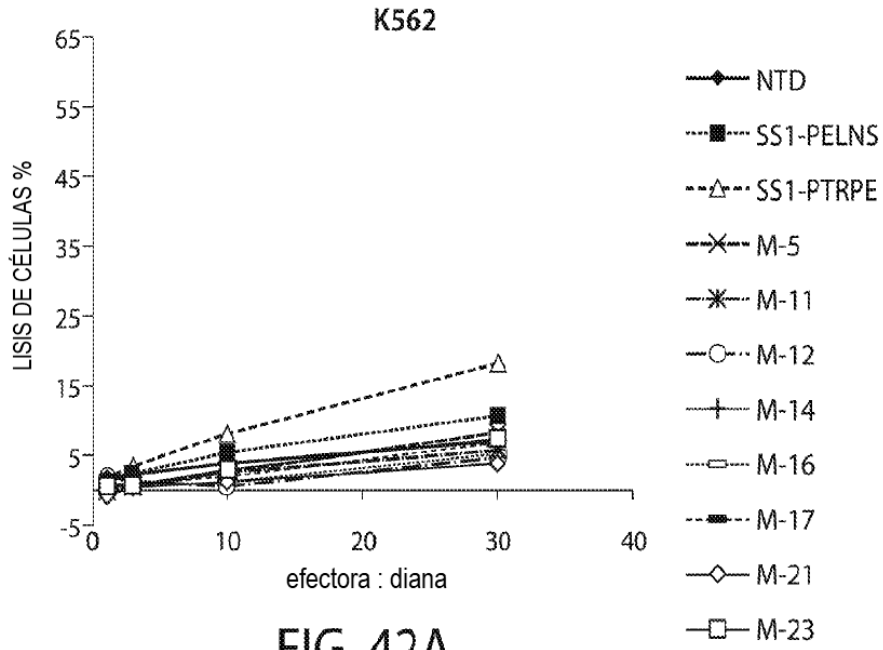
Antihumano de cabra

FIG. 41-5



Antihumano de cabra

FIG. 41-6



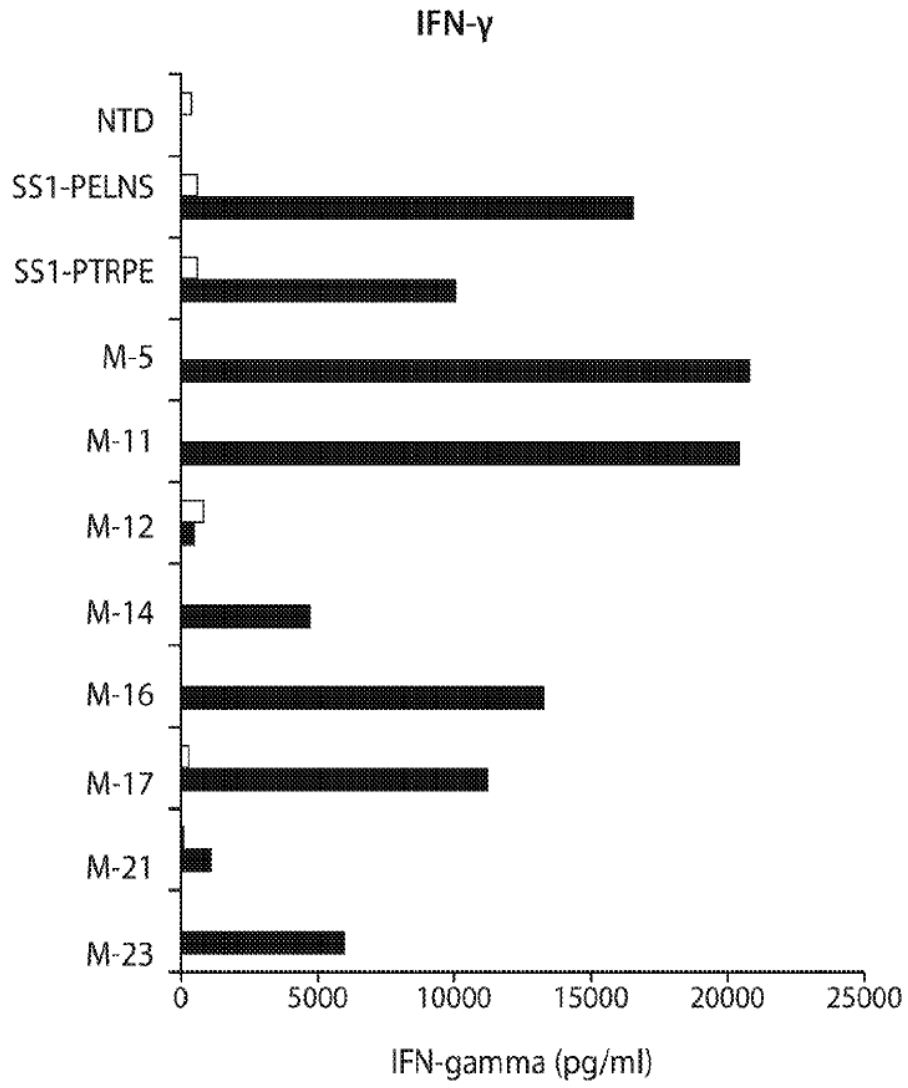


FIG. 43A

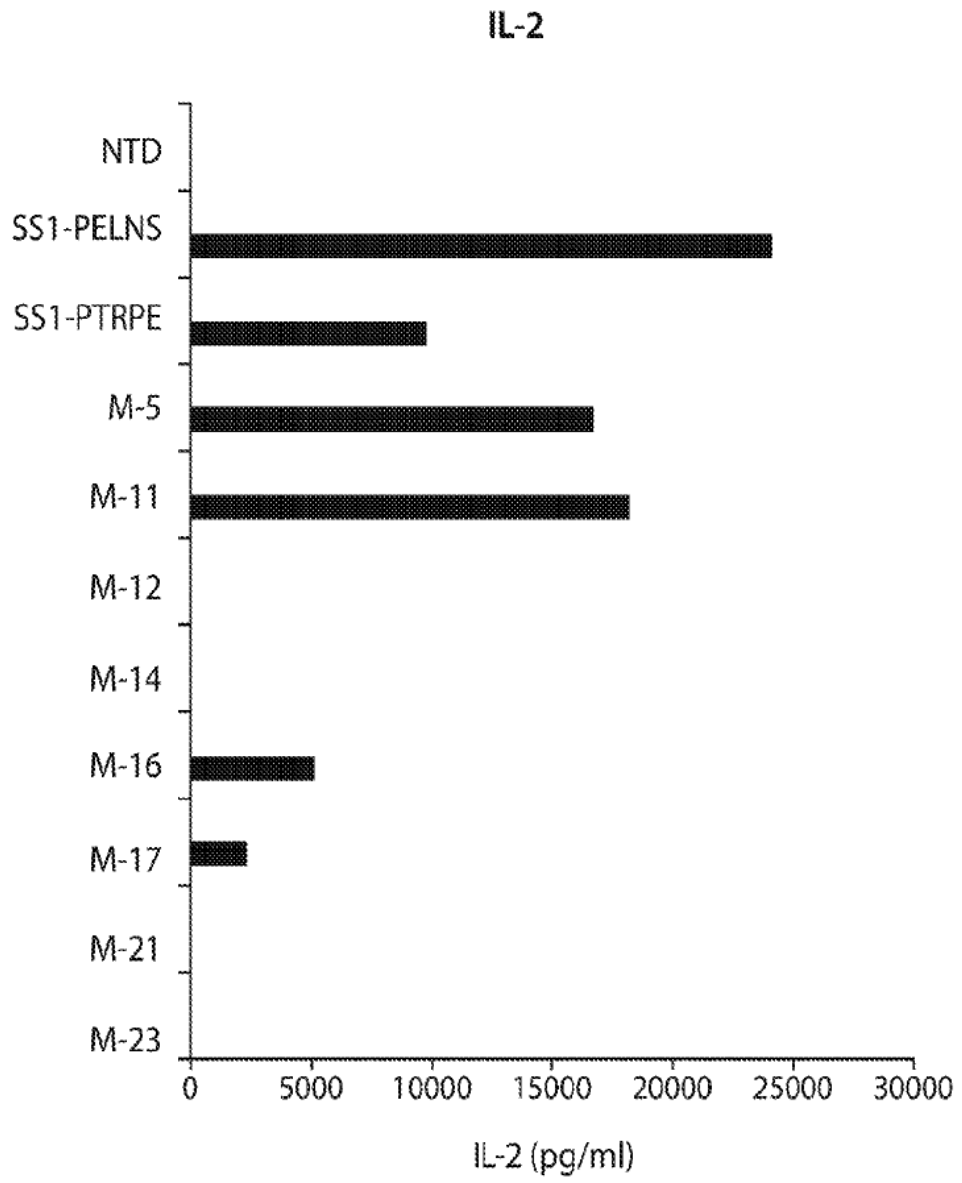


FIG. 43B

Construcos de vector



FIG. 44A



FIG. 44B

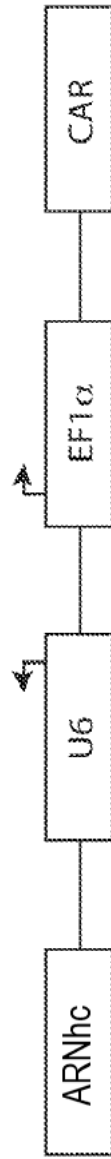


FIG. 44C



FIG. 44D



FIG. 44E

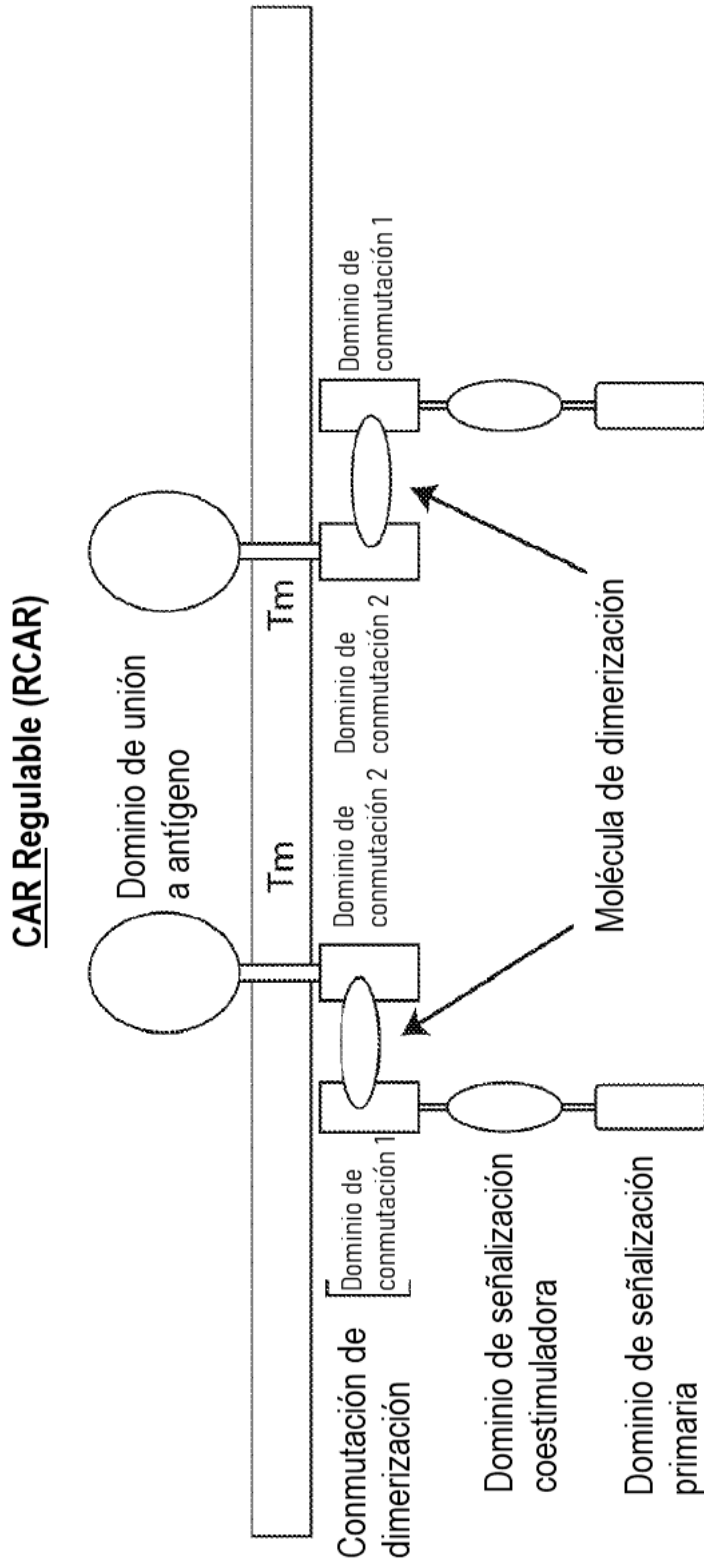


FIG. 45

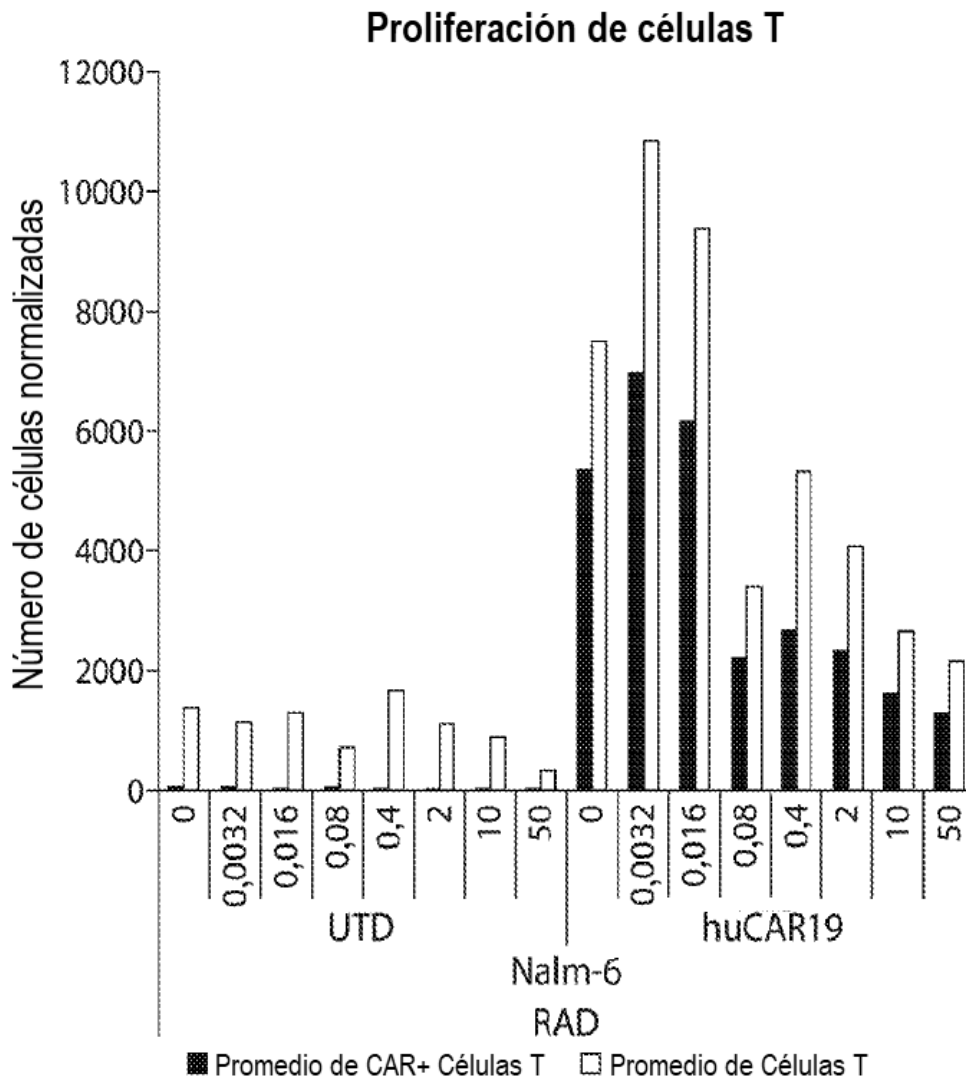


FIG. 46

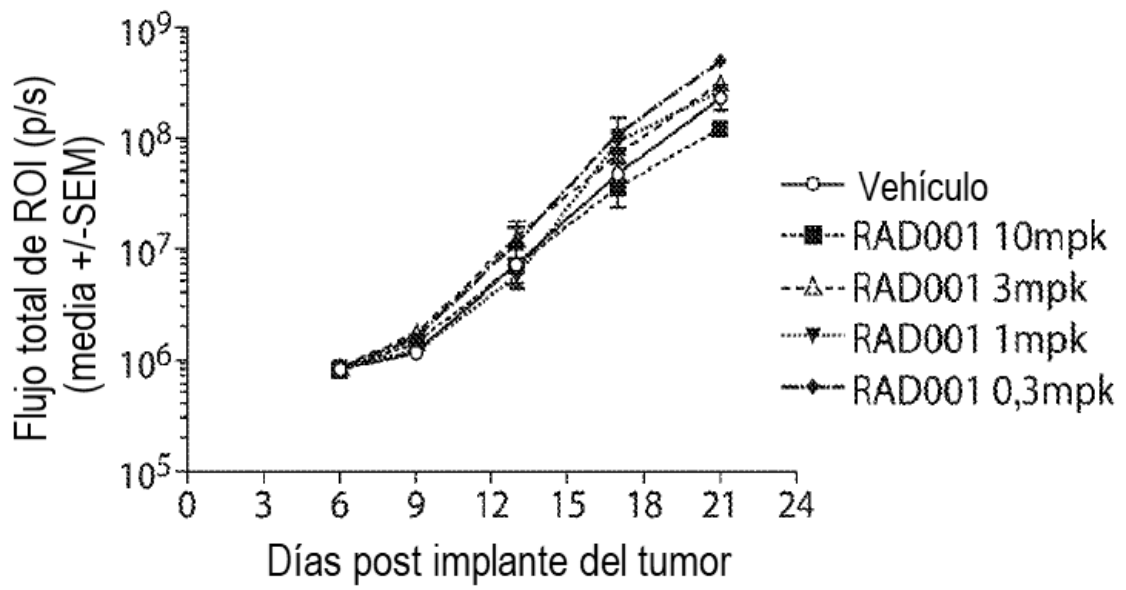


FIG. 47

Administración oral de RAD001: Día 0 PK en ratón NSG

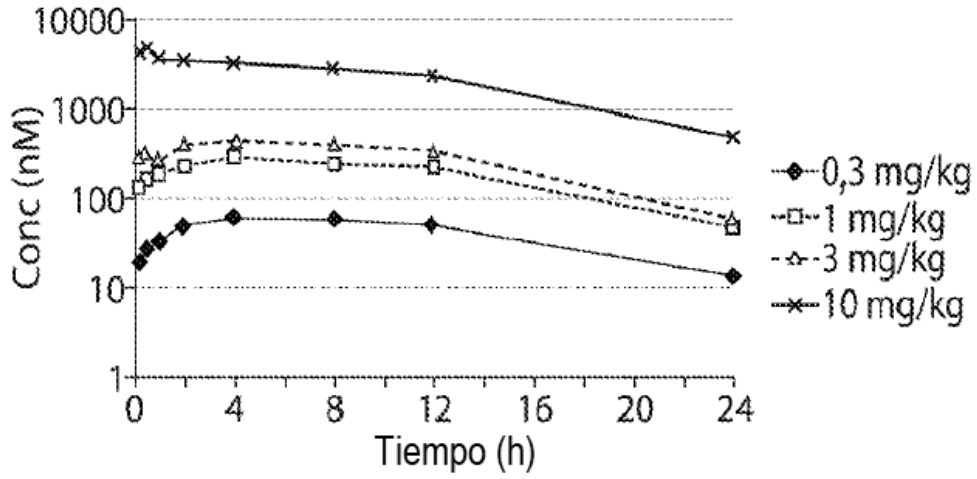


FIG. 48A

Administración oral de RAD001: Día 14 PK en ratón NSG

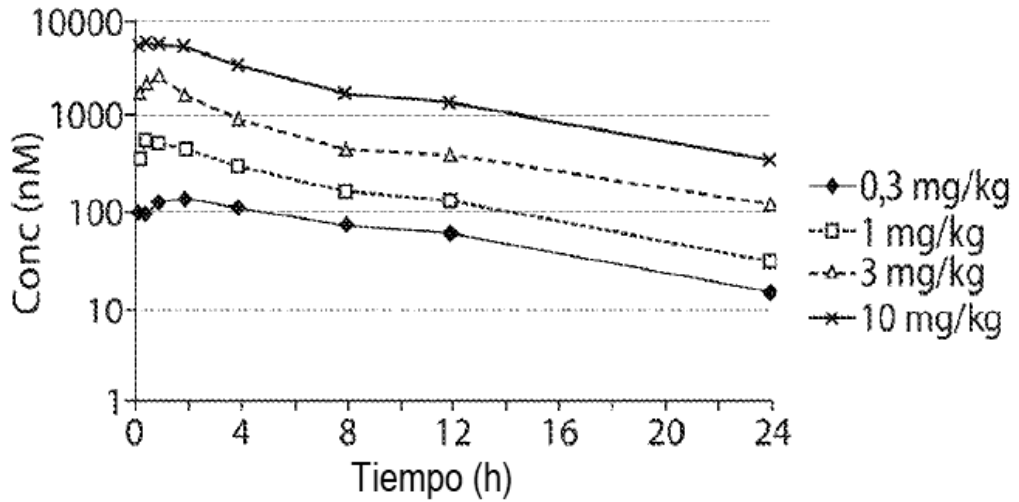


FIG. 48B

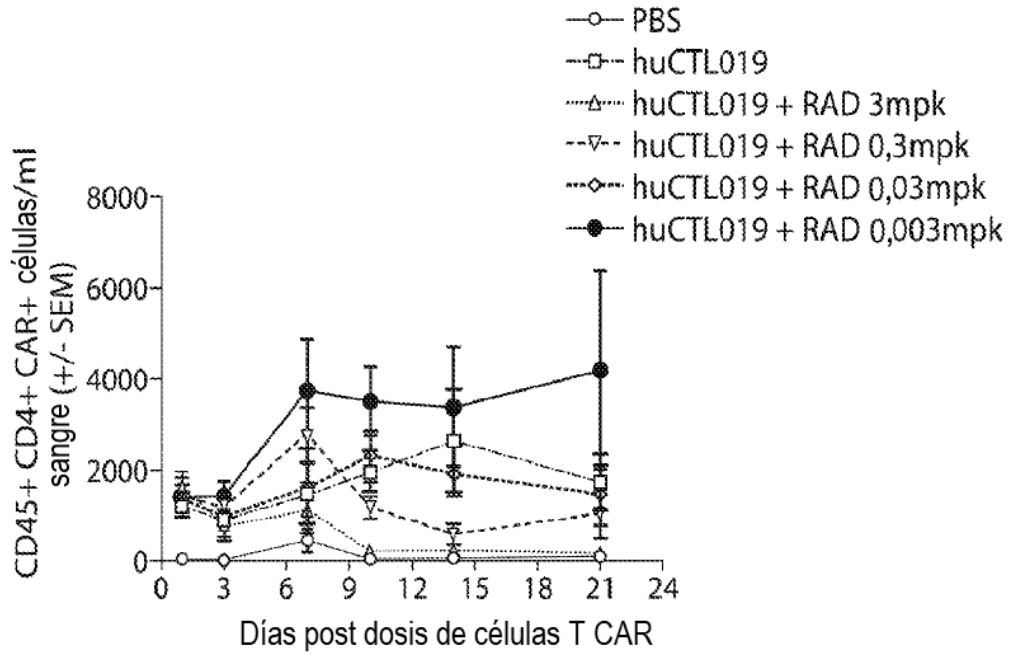


FIG. 49A

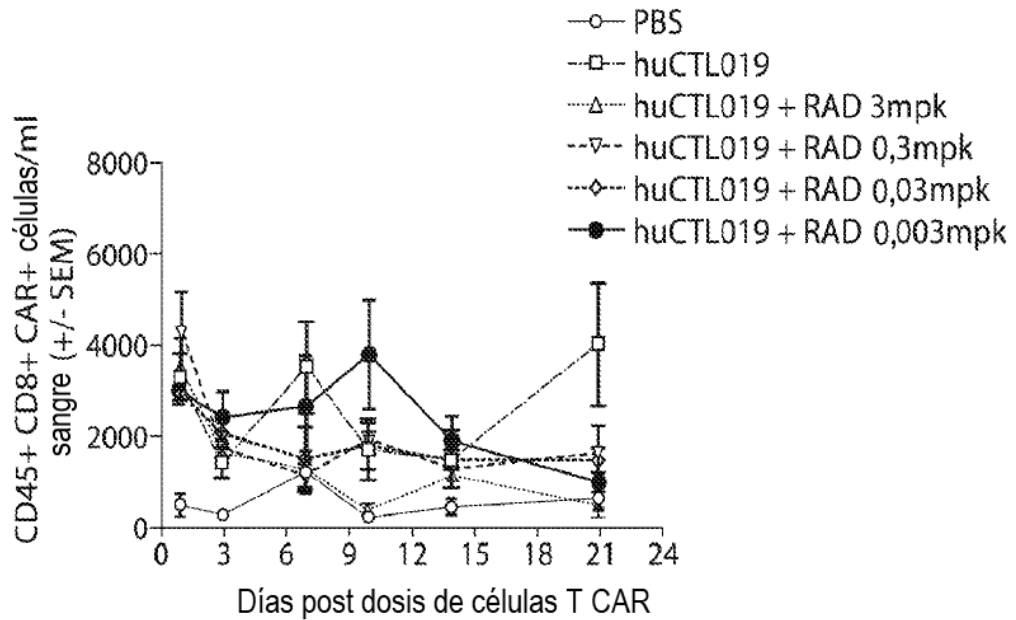


FIG. 49B