

**DIVERSOS DOMINIOS DE ENLACE DE ANTÍGENOS, NUEVAS PLATAFORMAS Y OTRAS
MEJORAS PARA TERAPIA CELULAR**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62 / 679,741, presentada el 1 de junio de 2018, cuyas descripciones se incorporan aquí para todos los propósitos.

CAMPO DE INVENCION

- 10 En el presente documento se proporcionan diversos dominios de unión a antígenos y nuevas plataformas para la construcción de receptores de antígenos quiméricos convencionales y de próxima generación para terapias celulares adoptivas para el cáncer, infecciones, trastornos alérgicos, degenerativos e inmunes. También se proporcionan enfoques novedosos para la activación y expansión de células T inmunes para terapias celulares adoptivas para el cáncer, infecciones, trastornos alérgicos, degenerativos e inmunes.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DE LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 Acompañando a esta presentación se encuentra un Listado de Secuencias titulado "Sequence_ST25.txt", creado el 1 de junio de 2019 y que tiene 80,373,218 bytes de datos, formateado en máquina en IBM-PC, sistema operativo MS-Windows. La lista de secuencias se incorpora aquí como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 20 Los CAR son inmunorreceptores sintéticos, que pueden redirigir las células T para destruir selectivamente las células tumorales. A diferencia del receptor fisiológico de células T (TCR), que se une a complejos HLA-péptido, los CAR se unen a moléculas que no requieren procesamiento de péptidos o expresión de HLA para ser reconocidas. Los CAR de primera generación iniciales se construyeron fusionando un dominio de unión a antígeno basado en scFv (fragmento variable de
25 cadena única) a un dominio transmembrana CD8 inerte, unido a un dominio de señalización citoplasmático derivado de cadenas receptor de Fc-γ o CD3-z. Para superar la falta de coestimulación de células T, los CAR de primera generación se modificaron aún más incorporando los dominios de señalización citoplasmática de los receptores coestimuladores de células T.

- 30 A pesar del éxito con las células CAR-T, existen varias limitaciones para este enfoque, que incluyen toxicidades tales como "síndrome de liberación de citocinas" (CRS) y neurotoxicidades. La inclusión del dominio coestimulador en el constructo CAR da como resultado una señalización tónica no fisiológica a través del receptor, que a su vez podría contribuir a su toxicidad y falta de persistencia.

- 35 Para superar algunas de las limitaciones de diseño de los CAR convencionales de segunda generación, se describieron varios diseños alternativos, denominados colectivamente CAR de próxima generación, que incluyen Ab-TCR (WO 2017/070608 A1 incorporado en la presente por referencia), proteínas de fusión del receptor TCR o TFP (WO 2016/187349 A1 incorporado en la presente por referencia), receptores inmunitarios sintéticos (SIR) (ver WO 2018/102795 A1, incorporado en la presente por referencia), acoplador de antígeno de linfocito T trifuncional (Tri-TAC) (ver WO 2015/117229 A1, incorporado en la presente por referencia). Estos diseños CAR alternativos, en
40 general, carecen de un dominio coestimulador.

SÍNTESIS

Las siguientes realizaciones y aspectos de las mismas se describen e ilustran junto con sistemas, composiciones y métodos que se pretende que sean ejemplares e ilustrativos, sin limitar su alcance.

En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona composiciones que comprenden células efectoras modificadas genéticamente (como células NK y células T) que incluyen polinucleótidos que codifican receptores de antígenos quiméricos, receptores inmunes sintéticos (SIR) y similares que se pueden utilizar en células adoptivas terapia para el tratamiento del cáncer, enfermedades infecciosas, autoinmunes y degenerativas. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona una plataforma de receptores inmunes sintéticos, denominados zSIR, que contienen dos cadenas CD3z. Las secuencias de polinucleótidos de las cadenas CD3z que se pueden usar en la construcción de zSIR se proporcionan, por ejemplo, en SEQ ID NO: 67 y 71. Las correspondientes secuencias de aminoácidos se proporcionan en SEQ ID NO: 4066 y 4070, respectivamente. La divulgación establece que el fragmento vL de un anticuerpo puede unirse a una de las dos cadenas CD3z y el fragmento vH puede unirse a la otra cadena CD3z. Cuando las dos cadenas de este tipo (por ejemplo, vL-CD3z y vH-CD3z) se coexpresan en la misma célula, los fragmentos vL y vH pueden unirse a su antígeno afín y transmitir una señal de célula T. En particular, las células T que expresan tal zSIR cuando se exponen a una línea celular que expresa el antígeno diana afín pueden activar la señalización de NFAT, inducir la producción de IL2, promover la proliferación de células T, promover la activación de células T y ejercer citotoxicidad. La expresión y actividad del zSIR se puede incrementar aún más mediante la incorporación de un enlazador entre los fragmentos vL / vH y CD3z. En particular, los dominios IgCL (SEQ ID NO: 28 y 4027) e IgCH (SEQ ID NO: 29 y 4028) derivados de anticuerpos sirven como enlazadores útiles entre los fragmentos vL / vH y CD3z.

La divulgación proporciona además varios dominios de unión a antígenos nuevos que se pueden usar en la generación de CAR convencionales (por ejemplo, CAR de segunda generación que contiene el dominio coestimulador 41BB) así como CAR de próxima generación como SIR, zSIR, Ab-TCR, Tri- TAC y TFP, para aplicaciones en terapia celular adoptiva. En algunas realizaciones, estos dominios de unión a antígeno se derivan de anticuerpos y antígenos diana expresados tanto en neoplasias hematológicas como en tumores sólidos. Las SEQ ID NOs de los fragmentos vL, vH y scFv de estos dominios de unión al antígeno se muestran en la **Tabla 3**. Las SEQ ID NOs de las regiones determinantes complementarias (CDR) de las cadenas ligera (vL) y pesada (vH) se muestran en **Tabla 4**. Las SEQ ID de ácidos nucleicos y aminoácidos de CAR convencionales ejemplares (es decir, CAR de segunda generación que contienen dominios coestimuladores 41BB) y CAR de próxima generación (por ejemplo, SIR, zSIR, Ab-TCR y TFP) basados en estos dominios de unión a antígeno se proporcionan en la **Tabla 6 y 7**. Los CAR que contienen estos dominios de unión a antígenos muestran diversas propiedades in vitro e in vivo, tales como afinidad de unión a los antígenos diana, secreción de citocinas, proliferación, citotoxicidad, agotamiento y persistencia a largo plazo. Como tal, los CAR que contienen estos antígenos diana se pueden usar para generar una respuesta inmune diversa. El polinucleótido, polipéptidos, construcciones de expresión, células modificadas por ingeniería recombinante que expresan CAR que comprenden los dominios de unión a antígeno de la divulgación, así como el método para fabricar y usar dichos polipéptidos, polinucleótidos y células se describen en métodos conocidos en la técnica y métodos descritos en PCT / US2017 / 024843, WO 2014/160030

A2, WO 2016/187349 A1, PCT / US2016 / 058305, WO 2015/117229 A1 y PCT / US17 / 64379, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Las células inmunes que expresan los CAR, tanto los CAR convencionales como los de próxima generación, que comprenden estos dominios de unión a antígenos se pueden generar y utilizar para la terapia celular adoptiva de cáncer, enfermedades infecciosas e inmunes utilizando métodos conocidos en la técnica y métodos descritos en PCT / US2017 / 024843. , WO 2014/160030 A2, WO 2016/187349 A1, PCT / US2016 / 058305, WO 2015/117229 A1 y PCT / US17 / 64379, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

La divulgación también proporciona un método para mejorar la transferencia de genes usando vectores lentivirales mediante la coexpresión de la proteína Vif y un CAR (por ejemplo, un CAR convencional, SIR, Ab-TCR, Tri-TAC o un TCR recombinante y similares) o Vif y cualquier otro gen terapéutico (por ejemplo, gen de la β -globina para el tratamiento de la anemia de células falciformes). En la SEQ ID NO: 11268 se proporciona un vector lentiviral ejemplar que codifica un CAR ((pLenti-EF1a-CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz-2A-Vif) y coexpresa Vif. En algunas realizaciones, la proteína Vif se proporciona en trans mediante la coexpresión de Vif en las células de empaquetamiento en el momento del empaquetamiento del vector lentiviral. En tal realización, la proteína Vif se empaqueta junto con el ARN que codifica el vector lentiviral en las partículas virales y se transfiere a las células diana. La proteína Vif se puede expresar en las células de empaquetamiento mediante métodos conocidos en la técnica.

En una realización ejemplar, la proteína Vif se expresa en las células de empaquetamiento cotransfectando un vector de expresión de mamífero (por ejemplo, PCDNA3-Vif; SEQ ID NO: 11269) que codifica Vif con el vector de transferencia lentiviral que codifica el gen o genes de interés (por ejemplo, pLenti-EF1 α -CD8SP-MYC3-WT1-Ab13-vL-V5- [hTCRb-KACIAH] -F-P2A-SP-WT1-Ab13-vH-Myc4- [hTCRa-CSDVP] -F-F2A- PAC-DWPRE; SEQ ID NO: 151) y vector (s) de empaquetamiento lentiviral. El vector de empaquetamiento lentiviral ejemplar incluye pMDLg / pRRE (plásmido de Addgene 12251), que es un plásmido de empaquetamiento lentiviral de tercera generación que codifica Gag y Pol y también requiere pRSV-Rev (Addgene # 12253) y el plásmido de expresión de envoltura pMD2.G (Addgene # 12259) para embalaje eficiente. Otro vector de empaquetamiento lentiviral es psPAX2 (plásmido de Addgene # 12260), que es un plásmido de empaquetamiento lentiviral de segunda generación y se puede usar con el plásmido de expresión de envoltura pMD2.G (Addgene # 12259) para empaquetar vectores lentivirales de 2da o 3ra generación. En una realización ejemplar, un plásmido que codifica Vif puede cotransfectarse con plásmidos psPAX2 y pMD2.G para empaquetar un vector lentivírico de 2^a o 3^a generación. En una realización ejemplar alternativa, un plásmido que codifica Vif puede cotransfectarse con plásmidos pMDLg / pRRE, pRSV-Rev y pMD2.G para empaquetar un vector lentiviral de 3^a generación. Vif también se puede coexpresar a partir del mismo vector (s) que codifica otras proteínas de empaquetamiento lentivirales (por ejemplo, gag, Pol y Rev).

En una realización ejemplar, el plásmido de empaquetamiento psPAX2 se modifica para coexpresar también Vif mediante métodos conocidos en la técnica. En una realización ejemplar alternativa, un plásmido de empaquetamiento lentivírico de 3^a generación que codifica Gag y Pol se modifica para expresar también Vif fusionando la secuencia de ácido nucleico que codifica Vif en marco con la secuencia de ácido nucleico que codifica Pol y separada de ella por una secuencia enlazadora escindible P2A. En alguna realización, Vif se expresa en las células de empaquetamiento de forma

transitoria mientras que en otras realizaciones Vif se expresa en las células de empaquetamiento de manera estable. En alguna realización, Vif se expresa en las células diana de forma transitoria mientras que en otras realizaciones Vif se expresa en las células diana de forma estable. En una realización, Vif se expresa en las células diana (por ejemplo, células T o células madre) de forma transitoria por electroporación de un vector de expresión de mamífero (por ejemplo, pCDNA3-Vif; SEQ ID NO: 11269) que codifica Vif o por electroporación del polipéptido Vif. Las células diana (por ejemplo, células T o células madre) que expresan de forma transitoria Vif se infectan posteriormente con un vector lentiviral que codifica un CAR o cualquier gen terapéutico de interés (por ejemplo, β -globina).

La naturaleza policlonal de la respuesta inmune es clave para su éxito en el control de diversas infecciones. En contraste, las terapias CAR actuales generalmente se basan en el direccionamiento de un solo antígeno y / o un solo epítipo de un solo antígeno. La pérdida del antígeno diana o del epítipo diana es una causa frecuente de fracaso de las terapias CAR actuales. Para superar esta limitación, la descripción proporciona CAR contra múltiples antígenos y contra múltiples epítopos de un solo antígeno. Estos CAR se pueden usar en combinaciones adecuadas para proporcionar una respuesta inmune adaptativa policlonal y diversa para la prevención o el tratamiento de enfermedades, tales como cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas y enfermedades degenerativas.

La divulgación también proporciona módulos accesorios que pueden expresarse en las células T transferidas de forma adoptiva (por ejemplo, células CAR-T, células TCR-T y TIL) para afectar su supervivencia, proliferación, activación, funciones efectoras (por ejemplo, secreción de citocinas, citotoxicidad, etc.), agotamiento y persistencia in vivo.

La divulgación proporciona al menos un polinucleótido recombinante que codifica al menos un receptor de antígeno quimérico (CAR) de primera generación o de próxima generación, comprendiendo el al menos un polinucleótido recombinante: (a) un primer dominio de ácido nucleico que codifica una transmembrana parcial o completo y / o un dominio citoplasmático y opcionalmente el dominio extracelular de una proteína endógena, en donde la proteína endógena se expresa en la superficie de los linfocitos y desencadena la activación y / o proliferación del linfocito; (b) opcionalmente un polinucleótido enlazador; y (c) un segundo dominio de ácido nucleico unido operativamente al primer dominio de ácido nucleico, en el que el segundo dominio de ácido nucleico codifica uno o más dominios de unión al antígeno TCR no naturales en los que el dominio de unión se selecciona de un dominio de unión establecido en la Tabla 3; (d) un tercer dominio de ácido nucleico opcional que codifica un dominio coestimulador; y un dominio de ácido nucleico adicional opcional que codifica un módulo accesorio.

En una realización, el primer ácido nucleico codifica parcial o totalmente al menos una cadena de receptor de células T (TCR) como se establece en la Tabla 13. En otra realización o adicional, el primer ácido nucleico codifica al menos un dominio transmembrana en Tabla 13 operativamente enlazada al dominio citoplásmico del tipo TCR. En otra realización, el polinucleótido codifica un CAR, donde el CAR comprende: (i) una cadena constante del receptor de células T (TCR) parcial o total que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 4038 a 4063, 12602-12638, y que puede comprender un módulo coestimulador opcional; (ii) un enlazador opcional; y (iii) uno o más dominios de unión al antígeno TCR no naturales unidos a (a) seleccionados de un dominio de unión establecido en

la Tabla 3; (iv) un módulo de acceso opcional; y (v) un dímero de un polipéptido que comprende (i) - (iv). En otra o más realización, el polinucleótido recombinante comprende una secuencia que codifica cualquiera de las secuencias de la Tabla 2. En otra o más realización, el módulo accesorio comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4103-4117 y 4090-4096. En otra realización o más, el CAR codificado comprende (1) cualquiera de los CAR 1-16 de la Tabla 1 y / o (2) una estructura principal de la Tabla 2; y (3) un dominio de unión de la Tabla 3. En otra realización adicional, (i) es una cadena constante de TCR de CD3z. En otra realización o adicional, el polinucleótido proporciona dos receptores de antígenos quiméricos de primera generación o de próxima generación. En otra realización o adicional, el polinucleótido codifica un dímero de cadenas constantes de CD3z.

La divulgación también proporciona al menos un polinucleótido recombinante que codifica al menos un receptor de antígeno quimérico (CAR) de próxima generación, comprendiendo el al menos un polinucleótido recombinante: (a) un primer dominio de ácido nucleico que codifica una transmembrana parcial o completa y / o dominio citoplasmático y, opcionalmente, el dominio extracelular de una proteína CD3z endógena que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 4064-4066, 4070-4072 y 4075-4078, en el que la proteína endógena se expresa en la superficie de los linfocitos y desencadena la activación y / o proliferación del linfocito; (b) opcionalmente un polinucleótido un enlazador; y (c) un segundo dominio de ácido nucleico unido operativamente al primer dominio de ácido nucleico, en el que el segundo dominio de ácido nucleico codifica uno o más dominios de unión al antígeno de TCR no naturales en los que el dominio de unión se selecciona de un dominio de unión establecido en la Tabla 3; y (d) un tercer dominio de ácido nucleico opcional que codifica un módulo coestimulador; y un ácido nucleico adicional opcional que codifica un módulo accesorio. En otra realización o adicional, las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína CD3z endógena se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 67 y 71. En otra o en una realización adicional, el al menos un CAR de próxima generación comprende dos CAR, cada uno de los cuales comprende una cadena CD3z. En otra o en una realización adicional, un fragmento vL de un anticuerpo está operativamente unido a una de las dos cadenas CD3z y un fragmento vH del anticuerpo está operativamente unido a la otra cadena CD3z. En otra forma de realización adicional, las cadenas vL y vH se seleccionan de pares en la Tabla 3 y 4 para un antígeno diana específico. En otra realización o adicional, se proporciona un enlazador entre las cadenas vL / vH y / o CD3z. En otra realización, un enlazador codificado se selecciona del grupo que consiste en IgCL (SEQ ID NO (DNA): 28 y SEQ ID NO (PRT): 4027) y dominios IgCH (SEQ ID NO (DNA): 29 y SEQ ID NO (PRT): 4028). En otra realización adicional, comprende además el tercer dominio de ácido nucleico que codifica un módulo coestimulador. En otra realización o adicional, el módulo coestimulador comprende una proteína 41BB o CD28. En otra o más realización, el módulo coestimulador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4067 y 4068. En otra o más realización, el módulo coestimulador comprende un dominio de señalización de uno o más de CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 y combinaciones de los mismos. En otra o más realización, comprende además el módulo accesorio, en el que el módulo accesorio comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 4103-4117 y 4090-4096.

La divulgación también proporciona una célula recombinante que expresa un homo o heterodímero de un receptor de antígeno quimérico (CAR) de primera generación o de próxima

generación, comprendiendo el homo o heterodímero: (a) un primer dominio de ácido nucleico que codifica una transmembrana parcial o completa y / o dominio citoplasmático y, opcionalmente, el dominio extracelular de una proteína endógena, donde la proteína endógena se expresa en la superficie de los linfocitos y desencadena la activación y / o proliferación del linfocito; (b) opcionalmente un
5 enlazador peptídico; y (c) un segundo dominio unido operativamente al primer dominio, en el que el segundo dominio comprende uno o más dominios de unión al antígeno TCR no naturales en los que el dominio de unión se selecciona de un dominio de unión establecido en la Tabla 3; y (d) un tercer dominio opcional que codifica un módulo coestimulador, y en el que la célula comprende opcionalmente un
10 módulo accesorio, en el que el homo o heterodímero se asocia en la superficie de la célula recombinante. En otra o más realización, la célula se transforma con al menos un polinucleótido recombinante como se describe en el presente documento. En otra realización o más, la célula es un linfocito T (célula T). En otra o más realización, la célula es una célula T ingenua, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora, Treg o una combinación de las mismas. En otra
15 realización o más, la célula es una célula asesina natural (NK), una célula madre hematopoyética (HSC), una célula madre embrionaria o una célula madre pluripotente. En otra realización o adicional, el módulo accesorio comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4103-4117 y 4090-4096. En otra realización o más, la célula recombinante expresa o se modifica por ingeniería genética para expresar HIV1-vif.

La divulgación proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende (a)
20 un primer dominio que codifica un dominio transmembrana y / o citoplasmático parcial o completo y, opcionalmente, el dominio extracelular de una proteína endógena, en el que la proteína endógena se expresa en la superficie de linfocitos y desencadena la activación y / o proliferación del linfocito; (b) opcionalmente un enlazador peptídico; y (c) un segundo dominio unido operativamente al primer
25 dominio, en el que el segundo dominio comprende uno o más dominios de unión al antígeno TCR no naturales en los que el dominio de unión se selecciona de un dominio de unión establecido en la Tabla 3; y (d) un tercer dominio opcional que codifica un módulo coestimulador. En otra o más realización, la proteína endógena comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4064-4066, 4070-4072, 4075-4078 y 12637. En otra o más realización, el primer ácido nucleico codifica
30 parcial o totalmente al menos una cadena de Receptor de células T (TCR) como se establece en la Tabla 13. En otra realización adicional, la primera comprende un dominio transmembrana en la Tabla 13 unido operativamente al dominio citoplásmico de un tipo TCR correspondiente. En otra o más realización, el CAR comprende: (i) una cadena constante parcial o completa del receptor de células T (TCR) que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 4038 a 4063, 12602-12638, y que puede comprender
35 un módulo coestimulador opcional.

La divulgación proporciona un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico como se describe anteriormente y en el presente documento.

La divulgación también proporciona un vector que comprende los polinucleótidos descritos en el presente documento.

La divulgación también proporciona un virus que comprende el polinucleótido (s) como se describe en el presente documento. En otra realización o adicional, el virus es un retrovirus, un adenovirus, un virus adenoasociado, un lentivirus, un virus de la viruela o un virus del herpes.

La divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cualquiera o más de las invenciones descritas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La divulgación también proporciona un método para tratar el cáncer que comprende: proporcionar la composición, una célula recombinante de la divulgación y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición o célula al sujeto para tratar el cáncer. En otra realización o más, el cáncer es cáncer de sangre. En otra realización, el cáncer de sangre es uno o más de leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásico, linfoma, mieloma múltiple y leucemia linfocítica aguda. En otra realización, el cáncer es un tumor sólido.

En una realización, aquí se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un SIR (es decir, un CAR de próxima generación), en el que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a CD19 y el SIR expresa opcionalmente una variante de codón optimizado de K13-vFLIP (K13-opt). En realizaciones ejemplares, las secuencias de fragmentos de ácido nucleico aislados que se dirigen a CD19 se establecen en las SEQ ID NO: 14056-14059 y 14109-14112. En realizaciones ejemplares, las secuencias de polipéptido aislado que se dirige a CD19 y que coexpresan opcionalmente K13-vFLIP se describen en las SEQ ID NO: 15800-15803 y 15853-15856. En algunas realizaciones, los fragmentos vL y vH que se dirigen a CD19 se describen en la Tabla 3 y se establecen en las SEQ ID NOs (ADN): 12662, 12693 y 12656 y 12687 y SEQ ID NOs (PRT): 14406, 14437 y 14400 y 14431. También se proporcionan en este documento polipéptidos codificados por ácidos nucleicos que codifican SIR y que codifican opcionalmente K13-vFLIP, en los que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a CD19. Además se proporcionan vectores que codifican ácidos nucleicos que codifican SIR y K13-vFLIP, en donde el dominio específico de Antígeno de los SIR objetivos CD19. En realizaciones ejemplares, se proporciona un vector que codifica un SIR que se dirige a CD19 en SEQ ID NO: 12641. También se proporcionan en la presente células genéticamente diseñadas (tales como células T, Células NT) que comprenden vectores que codifican ácidos nucleicos que codifican SIR y K13-vFLIP, en donde el dominio específico de antígeno de los SIR objetivos CD19. También se proporcionan métodos para el tratamiento y prevención de una enfermedad en donde las células que causan la enfermedad o las células asociadas con la enfermedad expresan CD19.

En una realización, aquí se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un SIR, en el que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a MPL y el SIR expresa opcionalmente una variante de codón optimizado de K13-vFLIP (K13-opt). En realizaciones ejemplares, las secuencias de fragmentos de ácido nucleico aislados que se dirigen a MPL se establecen en las SEQ ID NO: 13791-13792 y 13844-13845. En realizaciones ejemplares, las secuencias de polipéptido aislado dirigido a MPL y que coexpresan opcionalmente K13-vFLIP son las siguientes en SEQ ID NOs: 15535-15536 y 15588-15589. En algunas realizaciones, los fragmentos vL y vH que se dirigen a MPL se describen en la Tabla 3 y se establecen en las SEQ ID NOs (DNA): 12665, 12696 y 12658 y 12689 y SEQ ID NOs (PRT): 14409, 14440 y 14402 y 14433. También se proporcionan en el presente documento polipéptidos codificados por ácidos nucleicos que codifican SIR y que codifican opcionalmente K13-vFLIP, en los

que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a MPL. También se proporcionan en el presente documento vectores que codifican ácidos nucleicos que codifican SIR y K13-vFLIP, en los que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a MPL. En realizaciones ejemplares, se proporciona un vector que codifica un SIR que se dirige a MPL en SEQ ID NO: 14384. También se proporcionan en el presente documento células modificadas por ingeniería genética (tales como células T, células NKT) que comprenden vectores que codifican ácidos nucleicos que codifican SIR y que codifican opcionalmente K13-vFLIP, en los que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a MPL. También se proporcionan métodos para el tratamiento y prevención de una enfermedad en los que las células que causan la enfermedad o las células asociadas a la enfermedad expresan MPL.

En una realización, aquí se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un SIR, en el que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a BCMA y el SIR expresa opcionalmente una variante de codón optimizado de K13-vFLIP (K13-opt). En realizaciones ejemplares, las secuencias de fragmentos de ácido nucleico aislados que se dirigen a BCMA se establecen en las SEQ ID NO: 12890-12893, 12943-12946, 12996-12999, 13049-13052 y 12837-12840. En realizaciones ejemplares, las secuencias de polipéptido aislado que se dirige a BCMA y que coexpresan opcionalmente K13-vFLIP son las siguientes en las SEQ ID NO: 14634-14637, 14687-14690, 14740-14743, 14793-14796 y 14581-14584. En algunas realizaciones, los fragmentos vL y vH que se dirigen a BCMA se describen en la Tabla 3 y se establecen en las SEQ ID NOs (ADN): 12670 y 12701, 12669 y 12700, 12671-12702, 12657 y 12688, 12654 y 12685 y SEQ ID NOs. (PRT): 14414 y 14445, 14413 y 14444, 14415 y 14446, 14398 y 14429, y 14401 y 14432. También se proporcionan en el presente documento polipéptidos codificados por ácidos nucleicos que codifican SIR y que codifican opcionalmente K13-vFLIP, en los que el dominio específico de antígeno del SIR apunta a BCMA. También se proporcionan en este documento vectores que codifican ácidos nucleicos que codifican SIR y K13-vFLIP, en los que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a BCMA. En realizaciones ejemplares, se proporciona un vector que codifica un SIR que se dirige a BCMA en SEQ ID NO: 14378 y 14385. También se proporcionan en este documento células modificadas genéticamente (como células T, células NKT) que comprenden vectores que codifican ácidos nucleicos que codifican SIR y que codifican opcionalmente K13-vFLIP, en el que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a BCMA. También se proporcionan métodos para el tratamiento y la prevención de una enfermedad en la que las células que causan la enfermedad o las células asociadas a la enfermedad expresan BCMA.

En una realización, aquí se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un SIR, en el que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a MSLN y el SIR expresa opcionalmente una variante de codón optimizado de K13-vFLIP (K13-opt). En realizaciones ejemplares, las secuencias de fragmentos de ácido nucleico aislados que se dirigen a MSLN se exponen en las SEQ ID NO: 14268-14269, 14321-14322 y 14374-14375. En realizaciones ejemplares, las secuencias de polipéptido aislado que se dirige a MSLN y que coexpresan opcionalmente K13-vFLIP son las siguientes en las SEQ ID NO: 16012-16013, 16065-16066 y 16118-16119. En algunas realizaciones, los fragmentos vL y vH dirigidos a MSLN se describen en la Tabla 3 y se establecen en las SEQ ID NOs (ADN): 12668 y 12699, 12667 y 12698, y 12666-12697 y SEQ ID NOs (PRT): 14412 y 14443, 14411 y 14442, y 14410 y 14441. También se proporcionan en este documento polipéptidos codificados por ácidos nucleicos que codifican SIR y que codifican opcionalmente K13-vFLIP, en los que el dominio específico de

antígeno del SIR se dirige a MSLN. También se proporcionan en este documento vectores que codifican ácidos nucleicos que codifican SIR y K13-vFLIP, en los que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a MSLN. En realizaciones ejemplares, se proporciona un vector que codifica un SIR que se dirige a MSLN en SEQ ID NO: 14381 y 14383. También se proporcionan en este documento células modificadas genéticamente (como células T, células NKT) que comprenden vectores que codifican ácidos nucleicos que codifican SIR y que codifican opcionalmente K13-vFLIP, en el que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a MSLN. También se proporcionan métodos para el tratamiento y la prevención de una enfermedad en la que las células que causan la enfermedad o asociadas a la enfermedad expresan MSLN.

En una realización, aquí se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un SIR, en el que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a CD22 y el SIR expresa opcionalmente una variante de codón optimizado de K13-vFLIP (K13-opt). En realizaciones ejemplares, las secuencias de fragmentos de ácido nucleico aislados que se dirigen a CD22 se exponen en las SEQ ID NO: 13314-13317, 13420-13423, 13473-13476 y 14215-14218. En realizaciones ejemplares, las secuencias de polipéptido aislado que se dirige a CD22 y que coexpresan opcionalmente K13-vFLIP son las siguientes en SEQ ID NO: 15058-15061, 15164-15167, 15217-15220 y 15959-15962. En algunas realizaciones, los fragmentos vL y vH que se dirigen a CD22 se describen en la Tabla 3 y se establecen en las SEQ ID NOs (ADN): 12663 y 12694, 12655 y 12686, 12643 y 12674, 12652 y 12683 y SEQ ID NOs (PRT): 14407 y 14438, 14399 y 14430, 14387 y 14418, 14396 y 14427. También se proporcionan en este documento polipéptidos codificados por ácidos nucleicos que codifican SIR y que codifican opcionalmente K13-vFLIP, en donde el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a CD22. También se proporcionan en el presente documento vectores que codifican ácidos nucleicos que codifican SIR y K13-vFLIP, en los que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a CD22. En realizaciones ejemplares, se proporciona un vector que codifica un SIR que se dirige a CD22 en SEQ ID NO: 12640. También se proporcionan en el presente documento células modificadas genéticamente (como células T, células NK) que comprenden vectores que codifican ácidos nucleicos que codifican SIR y que codifican opcionalmente K13-vFLIP, en el que el dominio específico de antígeno del SIR se dirige a CD22. También se proporcionan métodos para el tratamiento y la prevención de una enfermedad en la que las células que causan la enfermedad o las células asociadas a la enfermedad expresan CD22.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra una representación esquemática de diferentes zSIR. CD3z-ECD, CD3z-TM, CD3z-CP se refiere a los dominios extracelular, transmembrana y citoplásmico de CD3z. 4-1BB y CD28 se refieren a los dominios coestimuladores citoplasmáticos de 4-1BB y CD28.

La Figura 2A-B representa la inducción de IFN γ tras el cocultivo de células CAR-T de la divulgación con células RAJI (Figura 2A) y células Nalm6 (Figura 2B).

La Figura 3 representa la eficacia in vivo de las células CAR-T de la divulgación en un modelo de xenoinjerto de células RAJI según se mide usando formación de imágenes por bioluminiscencia.

La Figura 4 representa la eficacia in vivo de las células CAR-T de la divulgación en un modelo de xenoinjerto de células Nalm6 según se mide usando imágenes de bioluminiscencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se utiliza en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el polinucleótido" incluye referencia a uno o más polinucleótidos y así sucesivamente.

Además, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. De manera similar, "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" se usan de manera intercambiable y no pretenden ser limitativos.

Se ha de entender además que, cuando las descripciones de diversas formas de realización utilizan el término "que comprende", las personas del oficio de nivel medio entenderán que, en algunos casos específicos, una forma de realización puede describirse de manera alternativa mediante el uso de las expresiones "que consiste esencialmente en" o "que consiste en"

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona del oficio de nivel medio al que pertenece esta invención.

El término "alrededor de" cuando se refiere a un valor cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$, o en algunos casos $\pm 10\%$, o en algunos casos $\pm 5\%$, o en algunos casos $\pm 1\%$, o en algunos casos $\pm 0.1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos o describir las composiciones en la presente.

El término "Ab-TCR" o "AbTCR" se refiere a una plataforma CAR de próxima generación como se describe en el WO 2017/070608 A1 que se incorpora en la presente por referencia. En una forma de realización, un Ab-TCR comprende una porción de anticuerpo que se fija específicamente a un antígeno diana fusionado a un módulo de TCR capaz de reclutar al menos un módulo de señalización de TCR. Los módulos de TCR de ejemplo que se pueden usar en la construcción de Ab-TCR se proporcionan en SEQ ID NO: 959-964 (**Tabla 6D**) y en WO 2017/070608 A1 que se incorpora en la presente por referencia. Los Ab-TCR ejemplares que se dirigen a BCMA y que coexpresan un módulo accesorio que codifica NEMO-K277A se proporcionan en SEQ ID NO: 4382-4383 (Tabla 6). Sin embargo, el módulo accesorio que codifica NEMO-K277A es opcional. Ab-TCR con los dominios de fijación al antígeno (es decir, fragmentos vL y vH, ligandos y receptores, etc.) descritos en la presente divulgación pueden construirse sin NEMO-K277A. Como tal, este módulo accesorio junto con la secuencia Furina-SGSG-F2A corriente arriba se puede eliminar del Ab-TCR. De manera alternativa, el módulo accesorio que codifica NEMO-K277A se puede reemplazar por módulos accesorios que codifican otras proteínas, tales como hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E, o IKK1-S176E-S180E, y MyD88 -L265P, FKBPx2-NEMO, NEMO-L600-FKBPx2, etc. Además, los módulos TCR presentes en el Ab-TCR pueden sustituirse por otros módulos TCR descritos en WO 2017/070608 A1.

El término "módulo accesorio" se refiere a un elemento que se coexpresa con un CAR (incluido el CAR de próxima generación como SIR, zSIR, Ab-TCR, Tri-TAC, TFP, etc.) y / o rTCR para aumentar, disminuir, regular o modificar la expresión o actividad de células que expresan CAR / rTCR o CAR / rTCR. Los módulos accesorios ejemplares incluyen uno o más de 41BBL, CD40L, HIV1-Vif,

vFLIP K13, MC159, cFLIP-L / MRIT α , cFLIP-p22, HTLV1 Tax, HTLV2 Tax, HTLV2 Tax-RS mutante, FKBPx2-K13, FKBPx2- HTLV2-Impuesto, FKBPx2-HTLV2-Impuesto-RS, IL6R-304-vHH-Alb8-vHH, IL12f, PD1-4H1 scFv, PD1-5C4 scFv, PD1-4H1-Alb8-vHH, PD1-5C4-Alb8-vHH, CTLA4-Ipilimumab-scFv, CTLA4-Ipilimumab-Alb8-vHH, IL6-19A-scFv, IL6-19A-scFv-Alb8-vHH, sHVEM, sHVEM-Alb8-vHH, hTERT, Fx06, hNEMO-K277A dirigida a Brd4 y shRNA combinación de los mismos. El módulo accesorio puede coexpresarse con el CAR / rTCR y similares usando un solo vector o usando dos o más vectores diferentes. En algunas realizaciones, los módulos accesorios reducen o previenen la toxicidad asociada con los CAR y / de los TCR y similares. En algunas realizaciones, el módulo accesorio mejora la eficacia de la transferencia génica mediada por lentivirales.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere a una secuencia de proteína o polipéptido derivada de una molécula de inmunoglobulina que se fija específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas monoclonales o policlonales, de cadena simple o múltiple o intactas, y pueden derivarse de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos pueden ser tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. El anticuerpo puede ser "humanizado", "quimérico" o no humano.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una porción de un anticuerpo que retiene la capacidad de interactuar específicamente (por ejemplo, por fijación, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) con un epítipo de un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab'h, fragmentos Fv, fragmentos de anticuerpos scFv, Fv ligados mediante disulfuro (sdFv), un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único (sdAb) tales como vL o vH, dominios vHH de camélidos, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos, tales como un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados mediante un puente disulfuro en la región bisagra, y una CDR aislada u otros fragmentos de fijación al epítipo de un anticuerpo. También se puede incorporar un fragmento de fijación al antígeno en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (ver, por ejemplo, Hollinger y Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de fijación a antígeno también pueden injertarse en soportes a base de polipéptidos tales como una fibronectina tipo III (Fn3) (ver patente estadounidense N.º 6,703,199, que describe minicuerpos de polipéptidos de fibronectina).

El término "cadena pesada de anticuerpos" se refiere al más grande de los dos tipos de cadenas de polipéptidos presentes en moléculas de anticuerpos en sus conformaciones naturales, y que normalmente determina la clase a la que pertenece el anticuerpo.

El término "cadena liviana de anticuerpos" se refiere al más pequeño de los dos tipos de cadenas de polipéptidos presentes en moléculas de anticuerpos en sus conformaciones naturales. Las cadenas livianas kappa (κ) y lambda (λ) se refieren a los dos isotipos principales de cadena liviana de anticuerpos.

El término "efecto anticancerígeno" se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por diversos medios, que incluyen, entre otros, una disminución en el volumen del tumor, una disminución en la cantidad de células cancerosas, una disminución en la cantidad de metástasis, un aumento en la esperanza de vida, disminución de la proliferación de células cancerosas, disminución

de la supervivencia de las células cancerosas, o mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto anticáncer" también se puede manifestar por la capacidad de un CAR, SIR, TFP, Ab-TCR, Tri-Tac, zSIR y similares en la prevención de la aparición de cáncer en primer lugar.

5 El "agente anticancerígeno" se refiere a agentes que inhiben la división y el crecimiento celular anormal, inhiben la migración de células neoplásicas, inhiben la invasividad o previenen el crecimiento y la metástasis del cáncer.

El término "antígeno" o "Ag" se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmunitaria.

10 El término "célula presentadora de antígeno" o "APC" se refiere a cualquier célula que expresa en su superficie un antígeno que puede ser reconocido por una célula inmunitaria o un anticuerpo que se une a una célula inmunitaria. Por ejemplo, un linfocito B que expresa CD19 puede servir como célula presentadora de antígeno para una célula T que expresa un CAR dirigido contra CD19. Una APC puede presentar un antígeno independiente de una molécula de MHC o en el contexto de una molécula de MHC. La APC puede presentar el antígeno en un complejo con complejos
15 principales de histocompatibilidad (MHC). Las células T pueden reconocer estos complejos MHC-antígeno utilizando sus receptores de células T (TCR). En una realización alternativa, una APC puede presentar un antígeno en su superficie que es reconocido por un natural (por ejemplo, CD28 o 41BB) o sintético (por ejemplo, CAR, SIR, zSIR, Ab-TCR, Tri-Tac o TFP, etc.) receptor expresado en células T independiente de MHC.

20 El término "sustrato presentador de antígeno" o "APS" se refiere a cualquier sustrato tal como una perla, una microperla, una placa o cualquier matriz que presente un antígeno extraño en su superficie. En una realización, un APS puede presentar un antígeno en su superficie que es reconocido por un receptor natural (por ejemplo, CD28 o 41BB) o receptor sintético (por ejemplo, un CAR convencional, un SIR, un zSIR, un Ab-TCR, un TFP) expresado en células T. En una realización
25 ejemplar, las perlas recubiertas con el dominio extracelular de CD19 en su superficie pueden servir como APS para las células T que expresan un CAR, SIR, zSIR, Ab-TCR o TFP convencional dirigido a CD19.

El término "efecto antiinfeccioso" se refiere a un efecto biológico que se puede manifestar por diversos medios, que incluyen, entre otros, por ejemplo, una disminución en el título del agente
30 infeccioso, una disminución en los recuentos de colonias del agente infeccioso, mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados con la condición infecciosa. Un "efecto antiinfeccioso" también puede manifestarse por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos en la prevención de la aparición de infección en primer lugar.

Como se usa en la presente, "afinidad" se utiliza para describir una medida de la fuerza de
35 fijación. La afinidad, en algunos casos, depende de la cercanía del ajuste estereoquímico entre un agente de fijación y su diana (por ejemplo, entre un anticuerpo y un antígeno que incluye epítopos específicos para el dominio de fijación), del tamaño del área de contacto entre ellos, y de la distribución de grupos cargados e hidrófobos. La afinidad generalmente se refiere a la "capacidad" del agente de fijación para fijarse a su diana. Existen numerosas formas utilizadas en la técnica para medir la
40 "afinidad". Por ejemplo, los métodos para calcular la afinidad de un anticuerpo para un antígeno son conocidos en la técnica, e incluyen el uso de experimentos de fijación para calcular la afinidad. La

afinidad de fijación puede determinarse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, interferometría de biocapa, interferometría de polarización dual, dispersión de luz estática, dispersión de luz dinámica, calorimetría de titulación isotérmica, ELISA, ultracentrifugación analítica y citometría de flujo. Un método de ejemplo para determinar la afinidad de fijación emplea resonancia de plasmón superficial. La resonancia del plasmón superficial es un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo, mediante el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ).

Un "dominio de fijación al antígeno" o "módulo de fijación a antígeno" o "segmento de fijación a antígeno" o "dominio específico de antígeno" (ASD) se refiere a un polipéptido o péptido que debido a su secuencia primaria, secundaria o terciaria, modificaciones postraduccionales y/o carga se fija a un antígeno con un alto grado de especificidad. El dominio de fijación al antígeno puede derivarse de diferentes fuentes, por ejemplo, un anticuerpo una proteína de fijación no inmunoglobulina, un ligando o un receptor.

"Avidéz" se refiere a la intensidad de la interacción entre un agente de fijación y su diana (por ejemplo, la intensidad de la interacción entre un anticuerpo y su diana antigénica, un receptor y su cognado, y similares). Los anticuerpos y las afinidades pueden caracterizarse fenotípicamente y compararse mediante ensayos funcionales (por ejemplo, ensayo de citometría de flujo y ensayo de Topanga).

El término "constante de asociación (K_a)" se define como la constante de equilibrio de la asociación de un receptor y ligando o anticuerpo y antígeno.

El término "autoantígeno" se refiere a un antígeno endógeno que estimula la producción de una respuesta autoinmunitaria, tal como la producción de autoanticuerpos. Los ejemplos de autoantígenos incluyen, entre otros, desmogleína 1, desmogleína 3 y fragmentos de estos.

Como se usa en la presente, el término "cadena principal" se refiere a la combinación específica de CAR (**Tabla 1**) y módulos accesorios como se describen en la **Tabla 2**. En formas de realización de ejemplo, en la **Tabla 2** se describen combinaciones específicas de CAR y módulos accesorios que comprenden varias cadenas principales. En una forma de realización, el CAR y el módulo accesorio están codificados por una única molécula de ácido nucleico. En otra forma de realización, el CAR está codificado por la primera molécula de ácido nucleico y el módulo accesorio está codificado por una segunda molécula de ácido nucleico. En algunas formas de realización, el módulo accesorio está codificado por más de una molécula de ácido nucleico, en función de la cantidad de componentes en los módulos accesorios.

Como se usa en la presente, los "resultados beneficiosos" pueden incluir, entre otros, disminuir o aliviar la gravedad de la enfermedad, evitar que la enfermedad empeore, curar la enfermedad, prevenir el desarrollo de la enfermedad, disminuir las posibilidades de que un paciente desarrolle la enfermedad, y prolongar la vida o la esperanza de vida de un paciente.

Como se usa en la presente, el término "dominio de fijación" o "molécula de anticuerpo" se refiere a una proteína, por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina o fragmento de esta, que comprende al menos un dominio, por ejemplo, secuencia de dominio variable de inmunoglobulina, que

puede fijarse a una diana con una afinidad mayor que un dominio no específico. El término abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

"Se fija al mismo epítipo que" significa la capacidad de un anticuerpo, scFv u otro dominio de fijación al antígeno para fijarse a un antígeno diana y que tiene el mismo epítipo que un anticuerpo, scFv u otro dominio de fijación al antígeno ejemplificado. Como ejemplo, los epítopos del anticuerpo, scFv u otro agente de fijación ejemplificado y otros anticuerpos pueden determinarse mediante técnicas estándar de mapeo de epítopos. El epítipo unido por el dominio de unión al antígeno de un CAR convencional o un CAR de próxima generación (por ejemplo, SIR, zSIR, TFP, Tri-Tac o Ab-TCR) también puede determinarse mediante el ensayo Epitope Binning. La preclasificación de epítopos es un inmunoensayo competitivo utilizado para caracterizar y luego clasificar una biblioteca de anticuerpos monoclonales contra una proteína diana. Los anticuerpos contra una diana similar se prueban contra todos los otros anticuerpos en la biblioteca por pares para comprobar si los anticuerpos bloquean la fijación de los demás anticuerpos al epítipo de un antígeno. Después de que cada anticuerpo tiene un perfil creado contra todos los demás anticuerpos en la biblioteca, se crea un perfil de bloqueo competitivo para cada anticuerpo con respecto a los demás en la biblioteca. Los perfiles de preclasificación relacionados estrechamente indican que los anticuerpos tienen el mismo epítipo o un epítipo estrechamente relacionado y están "agrupados" juntos. De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente mediante la determinación de la conformación espacial de los aminoácidos, por ejemplo, mediante intercambio de hidrógeno/deuterio, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Ver, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra. Las regiones antigénicas de las proteínas también se pueden identificar mediante gráficos de antigenicidad e hidropatía estándar, tales como los calculados con, por ejemplo, el programa de software Omiga versión 1.0 disponible a través de Oxford Molecular Group. Este programa de computadora emplea el método Hopp/Woods, Hopp et al, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci EE. UU. 78:3824-3828; para determinar los perfiles de antigenicidad, y la técnica Kyte-Doolittle, Kyte et al, (1982) J.Mol. Bioi. 157: 1 05-132; para parcelas de hidropatía. Para determinar si los anticuerpos monoclonales seleccionados contra una diana (por ejemplo, CD19) se fijan a epítopos únicos, cada anticuerpo se puede biotinilar con reactivos disponibles en el comercio (Pierce, Rockford, Ill.). Los estudios de competencia que usan anticuerpos monoclonales no etiquetados y anticuerpos monoclonales biotinilados se pueden realizar con placas de ELISA recubiertas con dominio extracelular CD19. La fijación de mAb biotinilado se puede detectar con una sonda de estrep-avidina-fosfatasa alcalina.

Como se usa en la presente, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" significa los sitios de combinación de antígeno no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de polipéptidos de cadena pesada y liviana. Estas regiones particulares fueron descritas por Kabat *et al.*, J. Bioi. Chern. 252:6609-6616 (1977); Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); Chothia *et al.*, J. Mol. Bioi. 196:901-917 (1987); y MacCallum *et al.*, J. Mol. Bioi. 25 262:732-745 (1996), donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o anticuerpos injertados o variantes de estos está destinada a estar dentro del alcance del término como se define y usa en la presente. Como se usa en la presente, las diferentes CDR de un anticuerpo

también podrían definirse mediante una combinación de las diferentes definiciones. Por ejemplo, VHCDR1 podría definirse en base a Kabat y VHCDR2 podría definirse en base a Chothia. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR definidas mediante cada una de las referencias citadas anteriormente son las siguientes:

5

DEFINICIONES DE CDR

		Kabat	Chothia	MacCallum
	VHCDR1	31-35	26-32	30-35
	VHCDR2	50-65	53-55	47-58
10	VHCDR3	95-102	96-100	193-101
	VLCDR1	24-34	26-32	30-36
	VLCDR2	50-56	50-52	46-55
	VLCDR3	89-97	91-96	89-96

(Los números de residuos corresponden a la referencia identificada).

15

El término "región marco" se refiere a las partes reconocidas en la técnica de una región variable de anticuerpo que existen entre las CDR más divergentes (es decir, hipervariables).

20

Se contemplan modificaciones en la secuencia de aminoácidos de las moléculas de unión descritas en este documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y / u otras propiedades biológicas de los fragmentos vL y / o vH de un CAR convencional o un CAR de próxima generación (por ejemplo, SIR, zSIR y similares). Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y / o inserciones y / o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de las moléculas de unión. Puede realizarse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales de las moléculas de unión, como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación. Preferiblemente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos pueden estar sustituidos en una CDR, mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 25 aminoácidos pueden estar sustituidos en las regiones de entramado (FR). Las sustituciones son preferiblemente sustituciones conservadoras como se describe en la presente memoria. Adicionalmente, o alternativamente, se pueden insertar o suprimir 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 aminoácidos en cada una de las CDRs (por supuesto, dependiendo de su longitud), mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos pueden insertarse o borrarse en cada una de las FRs.

25

30

35

Preferiblemente, las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y / o carboxilo-terminales que varían en longitud desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos a polipéptidos que contienen cien o más residuos, como así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Una variante de inserción de la molécula de unión incluye la fusión con el extremo N- o C-terminal del anticuerpo con una enzima o una fusión con un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

40

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen preferiblemente al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de aminoácidos en la molécula de unión reemplazados por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución

incluyen las CDR de la cadena pesada y / o ligera, en particular las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR en la cadena pesada y / o ligera.

Por ejemplo, si una secuencia de CDR comprende 6 aminoácidos, se prevé que uno, dos o tres de estos aminoácidos estén sustituidos. De manera similar, si una secuencia de CDR comprende 15 aminoácidos, se prevé que uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de estos aminoácidos estén sustituidos.

Generalmente, si los aminoácidos están sustituidos en una o más o todas las CDR de la cadena pesada y / o ligera, se prefiere que la secuencia "sustituida" obtenida entonces sea al menos 60%, más preferiblemente 65% , incluso más preferiblemente 70%, particularmente preferiblemente 75%, más particularmente preferiblemente 80% idéntica a la secuencia de CDR "original". Esto significa que depende de la longitud de la CDR hasta qué punto es idéntica a la secuencia "sustituida". Por ejemplo, una CDR que tiene 5 aminoácidos es preferiblemente 80% idéntica a su secuencia sustituida con el fin de tener al menos un aminoácido sustituido. Por consiguiente, las CDRs de la molécula de unión pueden tener diferentes grados de identidad con sus secuencias sustituidas, por ejemplo, CDRL1 puede tener 80%, mientras Que CDRL3 puede tener 90%.

Las sustituciones (o reemplazos) preferidas son sustituciones conservadoras. Sin embargo, se prevé cualquier sustitución (incluida la sustitución no conservadora o una o más de las "sustituciones ejemplares" que se enumeran a continuación) siempre que la molécula de unión conserve su capacidad de unirse al antígeno diana y / o sus CDR tengan una identidad con la secuencia entonces sustituida (al menos 60%, más del 65%, más del 70%, típicamente más del 75%, o más del 80% idéntica a la secuencia CDR "original").

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de uno por otra clase. Cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada de la molécula de unión puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. A la inversa, se pueden añadir enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, como un fragmento Fv).

Las SEQ ID de las CDR de los segmentos vL y vH ejemplares que se pueden usar para constituir los dominios de unión a antígeno de un CAR (por ejemplo, un CAR de segunda generación, un SIR, un zSIR, un Ab-TCR, Tri- Tac o una TFP) de la divulgación dirigida a diferentes antígenos se proporcionan en la **Tabla 4**.

En algunas formas de realización, la referencia a un módulo de fijación a antígeno (tal como un módulo de fijación a antígeno tipo Fab o Fv) que se fija específicamente a un antígeno diana significa que el módulo de fijación a antígeno se fija al antígeno diana con (a) una afinidad que es al menos alrededor de 10 (por ejemplo, alrededor de 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 o más) veces su afinidad de fijación para otras moléculas; o (b) una Kd de no más de alrededor de 1/10 (por ejemplo, 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/750, 1/1000 o menos) veces su Kd para fijarse a otras moléculas. La afinidad de fijación puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como ELISA, análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo de radioinmunoprecipitación (RIA). Kd puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como el ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR)

con, por ejemplo, instrumentos Biacore, o el ensayo de exclusión cinética (KinExA) con, por ejemplo, instrumentos Sapidyne.

"Cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, linfomas de células B (linfomas de Hodgkin y / o linfomas no Hodgkin), cáncer testicular, cáncer de pulmón y leucemia. Otros cánceres y trastornos proliferativos de células se reconocerán fácilmente en la técnica. Los términos "tumor" y "cáncer" se usan indistintamente en este documento, por ejemplo, ambos términos abarcan tumores sólidos y líquidos, por ejemplo, tumores difusos o circulantes. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" o "tumor" incluye cánceres y tumores premalignos, así como malignos.

Los "agentes quimioterapéuticos" son compuestos que se sabe que son útiles en quimioterapia para el cáncer.

Los "receptores de antígenos quiméricos" (CAR) son receptores de células T artificiales contemplados para su uso como terapia para el cáncer, utilizando una técnica denominada transferencia de células adoptivas. Los CAR se construyen específicamente para estimular la activación y proliferación de linfocitos T en respuesta a un antígeno específico al que se fija el CAR. Generalmente, un CAR se refiere a un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en las formas de realización más simples, que cuando se expresa en una célula efectora inmunitaria, proporciona a la célula especificidad para una célula diana, típicamente una célula cancerosa, y con generación de señal intracelular. En algunas formas de realización, un CAR comprende al menos un dominio de fijación al antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplásmica (también denominado en la presente "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora y/o molécula coestimuladora. En un aspecto, el dominio de señalización citoplásmica comprende además uno o más dominios de señalización funcionales derivados de al menos una molécula coestimuladora como se define a continuación. En una forma de realización, la molécula coestimuladora se selecciona entre las moléculas coestimuladoras descritas en la presente, por ejemplo, 4-1BB (es decir, CD137), CD27 y/o CD28. En una forma de realización, el CAR comprende una secuencia líder opcional en el terminal amino (N-ter) de la proteína de fusión CAR. En una forma de realización, el CAR comprende además una secuencia líder en el terminal N del dominio de fijación al antígeno extracelular, en donde la secuencia líder se escinde opcionalmente del dominio de fijación al antígeno (por ejemplo, un scFv) durante el procesamiento celular y la localización del CAR a la membrana celular. Normalmente, se utilizan "células CAR-T", que se refieren a células T que han sido diseñadas para contener un receptor de antígeno quimérico. Por tanto, los linfocitos T que llevan tales CAR se denominan generalmente linfocitos CAR-T. Un CAR de segunda generación que se dirige a CD19 y que comprende un péptido señal CD8, un dominio de unión a antígeno basado en CD19-AM1 scFv, un dominio transmembrana y bisagra CD8, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio estimulante CD3z está representado por SEQ ID NO: 799. Un CAR en el que el dominio coestimulador 4-1BB se reemplaza por un dominio coestimulador diferente (por ejemplo, CD28 o CD27) también se denomina CAR convencional. Para superar la limitación de los CAR convencionales, se han descrito varios diseños alternativos o CAR de próxima generación, que incluyen proteínas de fusión del receptor de TCR o TFP (documento WO

2016/187349 A1), anticuerpos TCR o AbTCR (PCT / US2016 / 058305). Tri-TAC (WO 2015/117229 A1) y receptores inmunes sintéticos o SIR (US 62 / 429,597 y PCT / US17 / 64379). Como se usa en el presente documento, el término "CAR" o "CAR" también abarca enfoques más nuevos (es decir, TFP, AbTCR, Tri-Tac, SIR y zSIR, etc.) para conferir especificidad de antígeno a las células. La presente divulgación proporciona varios nuevos dominios de unión a antígenos que se pueden usar para la generación de CAR. Aunque no se describe explícitamente, se prevé que estos dominios de unión a antígeno (por ejemplo, scFv, vL, vH o vHH, etc.) se pueden usar para generar los CAR convencionales de primera y segunda generación, así como enfoques más nuevos (es decir, TFP, AbTCR, Tri-Tac, SIR y zSIR, etc.) para conferir especificidad de antígeno a las células. Por lo tanto, los fragmentos vL y vH de un dominio de unión a antígeno dado pueden usarse para generar un SIR de doble cadena, un Ab-TCR de doble cadena o un zSIR de doble cadena cuando estos fragmentos se fusionan con las dos cadenas constantes (por ejemplo, TCRa / b o TCRg / d) que comprende un SIR, Ab-TCR o zSIR. El fragmento vL y vH del mismo dominio de unión a antígeno se puede unir mediante un enlazador flexible para generar un scFv que a su vez se puede usar para generar un CAR convencional de primera o segunda generación, un TFP o un Tri-TAC usando métodos conocidos en la arte.

"Optimización de codones" o "control de sesgo de codones de especies" se refiere al uso de codones preferido de una célula huésped en particular

Como se usa en este documento, "coexpresar" se refiere a la expresión de dos o más genes. Los genes pueden ser ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, una única proteína o una proteína quimérica como una única cadena polipeptídica. Por ejemplo, el zSIR descrito en el presente documento puede estar codificado por una única cadena polinucleotídica y sintetizado como una única cadena polipeptídica, que posteriormente se escinde en diferentes polipéptidos, cada uno de los cuales representa una unidad funcional distinta. En algunas realizaciones, en las que el zSIR consta de dos o más unidades polipeptídicas funcionales, las diferentes unidades funcionales se coexpresan utilizando una o más cadenas polinucleotídicas. En otra realización, las diferentes cadenas de polinucleótidos están unidas por secuencias de ácido nucleico que codifican conectores escindibles (por ejemplo, T2A, F2A, P2A, E2A, etc.). En otra realización, también se añade un motivo Ser-Gly-Ser-Gly (SGSG) (SEQ ID NO: 86-87 y 4085-86) cadena arriba de las secuencias del enlazador escindible para mejorar la eficacia de la escisión. Un inconveniente potencial de los enlazadores escindibles es la posibilidad de que la pequeña etiqueta 2A que queda al final de la proteína N-terminal pueda afectar la función de la proteína o contribuir a la antigenicidad de las proteínas. Para superar esto, en algunas realizaciones, se añade un sitio de escisión de furina (RAKR) (SEQ ID NO: 88-90 y 4087-4089) corriente arriba de los motivos SGSG para facilitar la escisión del péptido 2A residual después de la traducción. Los polinucleótidos que codifican las diferentes unidades de un zSIR pueden unirse mediante secuencias IRES (sitio de entrada ribosomal interno). Alternativamente, las diferentes unidades funcionales de un zSIR están codificadas por dos polinucleótidos diferentes que no están enlazados mediante un enlazador sino que están codificados por, por ejemplo, dos vectores diferentes. Las secuencias de ácido nucleico de enlazadores escindibles se proporcionan en SEQ ID NO: 80 a SEQ ID NO: 85.

Se reconocerá que las proteínas pueden tener identidad u homología entre sí y conservar funciones similares o idénticas. Por ejemplo, la divulgación incluye cadenas CD3z que tienen 85%,

90%, 95%, 97%, 98%, 98,5%, 99% o 99,9% de identidad con cualquiera de las secuencias descritas en este documento mientras conservan la actividad biológica.

El término "molécula coestimuladora" o "receptor coestimulador" se refiere a un compañero de fijación cognado en un linfocito T que se fija específicamente con un ligando coestimulador, para medir así una respuesta coestimuladora del linfocito T, tal como, entre otros, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, entre otras, una molécula MHC clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll, así como OX40, Dap10, CD27, CD28, CD2, CD5, CD8, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 y 4-1BB (CD137). Otros ejemplos de tales moléculas coestimuladoras incluyen CD8, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, 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, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IP0-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a y un ligando que se fija específicamente a CD83. Un dominio de señalización intracelular coestimulador puede ser la porción intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora puede representarse en las siguientes familias de proteínas: proteínas receptoras de TNF, proteínas de tipo inmunoglobulina, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM) y receptores de células NK activadoras. Los ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ICAM-1, antígeno asociado a la función de linfocitos 1 (LFA-1), CD2, CD8, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3 y un ligando que se fija específicamente a CD83 y similares. El dominio de señalización intracelular puede comprender la porción intracelular completa, o el dominio de señalización intracelular nativo completo, de la molécula de la que deriva, o un fragmento funcional o derivado de esta.

El término "antígeno específico de enfermedad" o "antígeno asociado a enfermedad" o "antígeno causante de enfermedad" se refiere a un antígeno expresado en células que contribuyen al desarrollo de una enfermedad.

El término "célula que causa una enfermedad" o "célula asociada a una enfermedad" se refiere a una célula que contribuye al desarrollo de una enfermedad. Las células causantes de enfermedades ejemplares incluyen células cancerosas y células infectadas por virus. Las células no cancerosas, como los linfocitos B y los linfocitos T, se han asociado con la patogenia de enfermedades inmunitarias, alérgicas, degenerativas e infecciosas y también se consideran células causantes de enfermedades.

El término "antígeno que soporta la enfermedad" se refiere a un antígeno expresado en células que favorece la supervivencia, proliferación, persistencia o actividad de las células que causan enfermedades. En algunas realizaciones, el antígeno que soporta la enfermedad es un antígeno presente en las células estromales. Sin desear estar ligado a la teoría, en algunas realizaciones, las células que expresan CAR destruyen las células que soportan la enfermedad, bloqueando así indirectamente el crecimiento o la supervivencia de las células que causan la enfermedad. Los

antígenos de células estromales ejemplares incluyen antígeno 2 de células estromales de médula ósea (BST2), proteína de activación de fibroblastos (FAP) y tenascina.

El término "trastornos degenerativos" se refiere a una enfermedad que es el resultado de un proceso continuo a base de cambios celulares degenerativos, que afectan tejidos u órganos, que se deteriorarán cada vez más con el tiempo, ya sea debido al desgaste corporal normal o a elecciones de estilo de vida, tales como ejercicio o hábitos alimenticios. Las enfermedades degenerativas de ejemplo incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, ataxia de Friedreich, diabetes mellitus (tipo II) y aterosclerosis.

El término "derivado de", como se usa en la presente, indica una relación entre una primera y una segunda molécula. Se refiere generalmente a la similitud estructural entre la primera molécula y una segunda molécula y no connota o incluye una limitación de proceso o fuente en una primera molécula que se deriva de una segunda molécula. Por ejemplo, en el caso de un dominio de fijación al antígeno que se deriva de una molécula de anticuerpo, el dominio de fijación al antígeno retiene suficiente estructura de anticuerpo de modo que tiene la función requerida, es decir, la capacidad de fijarse a un antígeno.

La frase "enfermedad asociada con la expresión de un antígeno diana" o "antígeno asociado con enfermedad como se describe en la presente" incluye, entre otros, una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno diana como se describe en la presente o una afección asociada con células que expresan un antígeno diana como se describe en la presente, que incluye, por ejemplo, enfermedades proliferativas tales como un cáncer o neoplasia, o una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con células que expresan un antígeno diana como se describe en la presente. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en la presente es un cáncer hematológico. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en la presente es un cáncer sólido. Las enfermedades adicionales asociadas con la expresión de un antígeno tumoral descrito en la presente incluyen, entre otros, tipos de cáncer atípicos y/o no clásicos, neoplasias, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en la presente. Las indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de un antígeno diana como se describe en la presente incluyen, por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplante. En algunas formas de realización, las células que expresan el antígeno diana expresan, o en cualquier momento expresan, mARN que codifica el antígeno diana. En otra forma de realización, las células que expresan el antígeno diana producen la proteína de antígeno diana (por ejemplo, de tipo silvestre o mutante), y la proteína de antígeno diana puede estar presente a niveles normales o niveles reducidos. En otra forma de realización, las células que expresan el antígeno diana produjeron niveles detectables de una proteína de antígeno diana en un punto, y posteriormente no produjeron sustancialmente proteína de antígeno diana detectable.

"Enfermedad dirigida por células modificadas genéticamente", como se usa en este documento, abarca la orientación de cualquier célula involucrada de cualquier manera en cualquier enfermedad por una célula modificada genéticamente que se adapta a la enfermedad o un tejido o tipo

de célula diana, independientemente de si el las células modificadas se dirigen a células enfermas o células sanas para lograr un resultado terapéuticamente beneficioso.

El término "constante de disociación (Kd)" se define como la constante de equilibrio de la disociación de una interacción receptor-ligando.

5 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, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (por ejemplo, rRNA, tRNA y mRNA) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de la misma. Por tanto, un gen, ADNc o ARN codifica una
10 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 secuencia de ARNm y generalmente se proporciona en listas de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden denominarse codificantes del 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 entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir en trans en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener en alguna versión un intrón (es).

20 El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, como se describe en el presente documento, eficaz para lograr un resultado biológico particular.

El término "endógeno", "nativo" o "de origen natural" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema. También se refiere a un gen, proteína, ácido
25 nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, etc.) o un fragmento del mismo que es nativo de una célula o se expresa naturalmente en una célula.

El término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "expresión" se refiere a la transcripción y / o traducción de una secuencia de
30 nucleótidos particular dirigida por un promotor y / u otros elementos reguladores.

El término "vector de transferencia" se refiere a una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Por tanto, el término "vector de transferencia" incluye un plásmido o virus de replicación autónoma. El término también debe interpretarse para incluir además compuestos no
35 plásmidos y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, un compuesto de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores de transferencia viral incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales y similares.

Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, incluidos cósmidos,
40 plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

Como se usa en la presente, un "epítopo" se define como la porción de un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, o la porción de un antígeno que se fija a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los epítomos pueden ser una secuencia o subsecuencia de proteínas.

El término "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión ligadas operativamente a una secuencia de nucleótidos que se debe expresar. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, que incluyen cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus asociados a adena) que incorporan el polinucleótido recombinante.

El término "unidad polipeptídica funcional (FPU)" de, por ejemplo, un zSIR, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia señal amino terminal unida funcionalmente a un dominio de unión a antígeno y, por ejemplo, a una cadena CD3z. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno se encuentra entre la secuencia señal y la cadena CD3z.

El término "porción funcional" cuando se usa en referencia a, por ejemplo, un zSIR se refiere a cualquier parte o fragmento de un polipéptido, por ejemplo, el zSIR, cuya parte o fragmento retiene la actividad biológica de la molécula deseada, por ejemplo, de el zSIR, del cual es parte (el padre zSIR). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un zSIR que retienen la capacidad de reconocer células diana, o detectar, tratar o prevenir una enfermedad, en una medida similar, la misma medida o en mayor medida, como el zSIR parental. En referencia al zSIR parental, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, alrededor de 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% o más del zSIR parental.

Las "células modificadas genéticamente", las "células redirigidas", las "células modificadas por ingeniería genética" o las "células modificadas" como se utilizan en este documento se refieren a células que se han modificado para expresar un CAR (por ejemplo, un CAR convencional de segunda generación, TFP, AbTCR, SIR, Tri-Tac y zSIR) o un TCR recombinante. Por ejemplo, un linfocito T modificado genéticamente que expresa un CAR o un zSIR es una célula modificada genéticamente.

El término "trastorno inmunitario" se refiere a una enfermedad caracterizada por la disfunción del sistema inmunitario. Una enfermedad autoinmunitaria es una afección que surge de una respuesta inmunitaria anormal a una parte normal del cuerpo. Hay al menos 80 tipos de enfermedades autoinmunitarias.

"Célula efectora inmunitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que está implicada en una respuesta inmunitaria, por ejemplo, en la promoción de una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de células efectoras inmunes incluyen células T, por ejemplo, células T alfa / beta y células T gamma / delta, células B y células T asesinas naturales (NKT).

"Célula que expresa el receptor inmunológico", como se usa el término en el presente documento, se refiere a una célula que está implicada en una respuesta inmunitaria, por ejemplo, en la promoción de una respuesta efectora inmunitaria y expresa uno o más receptores inmunitarios, tales como, para ejemplo, un TCR endógeno, un TCR recombinante o un CAR. Ejemplos de células que expresan receptores inmunes incluyen células T, por ejemplo, células T alfa / beta y células T gamma / delta y células NKT.

"Función efectora inmunitaria o respuesta efectora inmunitaria", como se usa en este documento, se refiere a la función o respuesta, por ejemplo, de una célula efectora inmunitaria, que mejora o promueve un ataque inmunológico de una célula. La función o respuesta efectora 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 efectora inmunitaria.

Un "dominio de señalización intracelular", como se usa el término en este documento, se refiere a una porción de señalización intracelular de una molécula. El dominio de señalización intracelular genera una señal que promueve, por ejemplo, una función efectora inmunitaria de la célula que contiene CAR (por ejemplo, CAR de 2ª generación, TFP, AbTCR, SIR, Tri-TAC y / o zSIR). Los ejemplos de función efectora inmunitaria incluyen actividad citolítica y actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas. Las cadenas de TCR α / β / γ / δ no tienen un dominio de señalización intracelular propio, pero transmiten una señal al asociarse con otras cadenas del complejo de señalización de TCR (por ejemplo, CD3z, CD3e, CD3d y CD3g) que poseen un dominio de señalización. En otra forma de realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario. Los dominios de señalización intracelulares primarios de ejemplo incluyen los derivados de las moléculas responsables de la estimulación primaria o simulación dependiente de antígeno. En otra forma de realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio intracelular coestimulador. Los dominios de señalización intracelular coestimuladores de ejemplo incluyen los derivados de moléculas responsables de señales coestimuladoras, o estimulación independiente del antígeno. Por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primario puede comprender una secuencia citoplásmica de CD3z, y un dominio de señalización intracelular coestimulador puede comprender una secuencia citoplásmica de correceptor o molécula coestimuladora, tal como CD28 o 41BB.

Un dominio de señalización intracelular primario puede comprender un motivo de señalización que se conoce como un motivo de activación inmunoreceptor a base de tirosina o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplásmicas primarias incluyen, entre otros, los derivados de CD3 zeta, FeR gamma común (FCER1G), Fe gamma RIIa, FeR beta (Fe Épsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD79a, CD79b, DAPIO y DAP12.

Como se usa en este documento, el término "enlazador" (también "dominio enlazador" o "región enlazadora") se refiere a un oligo o polipéptido que une dos o más dominios o regiones de un CAR (por ejemplo, CAR de segunda generación, TFP, AbTCR, SIR y zSIR) descritos en el presente documento. El enlazador puede tener una longitud de entre 1 y 500 aminoácidos. En algunas realizaciones, el "enlazador" es escindible o no escindible. A menos que se especifique lo contrario, el término "ligador" utilizado en la presente significa un ligador no escindible. Dichos ligadores no escindibles pueden estar compuestos de residuos flexibles que permiten libertad de movimiento de los dominios de proteínas adyacentes entre sí. Ejemplos no limitativos de tales residuos incluyen glicina y serina. En algunas formas de realización, los ligadores incluyen residuos no flexibles. Las realizaciones ejemplares de enlazadores con enlazadores no flexibles son EAAAK (SEQ ID NO: 4011), E-coil (SEQ ID NO: 4009), K-coil (SEQ ID NO: 4010) o PG4SP (SEQ ID NO: 4007). En otras realizaciones, el enlazador que une el dominio de unión al antígeno y las cadenas CD3z de un zSIR comparten una

longitud similar. En otras realizaciones, el enlazador que une el dominio de unión al antígeno y las cadenas CD3z de un zSIR difieren en longitud en no más de 20 aminoácidos, típicamente en no más de 10 aminoácidos, preferiblemente en no más de 5 aminoácidos, más preferiblemente en no más de 2 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador que une el dominio de unión al antígeno y las cadenas CD3z de un zSIR tienen una composición de aminoácidos idéntica o similar. Los conectores ejemplares con una composición idéntica son PG4SP (SEQ ID NO: 4007) y PG4SP-v2 (SEQ ID NO: 4008). En algunas realizaciones, los enlazadores que unen el dominio de unión al antígeno y las cadenas CD3z de un zSIR son PG4SP (ADN SEC ID NO: 8; PRT SEC ID NO: 4007) y PG4SP-v2 (ADN SEC ID NO: 9; PRT SEQ ID NO: 4008).

En algunas realizaciones, los conectores que se unen a los dominios de unión a antígeno y las cadenas CD3z de un zSIR se derivan de anticuerpos. En una realización, el enlazador que une una región vL y una cadena CD3z de un zSIR es IgCL (ADN SEQ ID NO: 28; PRT SEQ ID NO: 4027) y el enlazador que une una región vH y una cadena CD3z de un zSIR es IgG1-CH1 (ADN SEQ ID NO: 29 y PRT SEQ ID NO: 4028). En algunas realizaciones, el enlazador que une el dominio de unión al antígeno respectivo y la cadena CD3z de un zSIR son IgCL (ADN SEQ ID NO: 28; PRT SEQ ID NO: 4027) e IgG2-OC-CH1 (ADN SEQ ID NO: 30; PRT SEQ ID NO: 4029). En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender una etiqueta de epítipo. En algunas realizaciones, la etiqueta de epítipo se selecciona del grupo que consiste en una etiqueta MYC, una etiqueta V5, una etiqueta AcV5, una StreptagII, una etiqueta FLAG o HA. En algunas realizaciones, el enlazador no escindible tiene una longitud suficiente para asegurar que dos dominios adyacentes no interfieran estéricamente entre sí. En una realización de la divulgación, se añaden tres residuos de aminoácidos (Gly-Ser-Gly) al carboxi-terminal de los enlazadores (por ejemplo, Etiqueta Myc o etiqueta V5) que se encuentran entre el dominio de unión al antígeno y las cadenas CD3z de el zSIR. En determinadas realizaciones, los enlazadores pueden portar secuencias adicionales, tales como sitios de enzimas de restricción.

El término "ligador de polipéptido flexible", como se usa en la presente, se refiere a un ligador de péptido que consiste en aminoácidos tales como residuos de glicina y/o serina usados solos o en combinación, para ligar cadenas de polipéptidos (por ejemplo, regiones de cadena liviana variable y pesada variable). En una forma de realización, el ligador de polipéptido flexible es un ligador de Gly/Ser y comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser) n en donde n es un número entero positivo igual a o mayor de 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 forma de realización, los ligadores de polipéptidos flexibles incluyen, entre otros, (Gly4Ser) 4 o (Gly4Ser) 3 (SEQ ID NO:5). En otra realización, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly2Ser), (GlySer) o (Gly3Ser). También se incluyen dentro del alcance de la divulgación los ligadores descritos en W02012/138475, incorporados en la presente por referencia.

El término "lentivirus" se refiere a un género de la familia Retroviridae. El VIH, el VIS y el VIF son todos ejemplos de lentivirus.

El término "vector lentiviral" se refiere a un vector derivado de al menos una porción de un genoma de lentivirus, que incluye especialmente un vector lentiviral auto-inactivador como se proporciona en Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores de lentivirus que pueden usarse en la clínica incluyen, entre otros, por ejemplo, la tecnología de administración de genes LENTIVECTOR® de Oxford BioMedica, el sistema de vectores LENTIMAX™

de Lentigen y similares. Otros ejemplos de vectores lentivirus son pLENTI-EF1 α (SEQ ID NO: 129), pLENTI-EF1 α -DWPRES (SEQ ID NO: 130) y pCCLc-MNDU3 (SEQ ID NO: 12639).

Como se usa en este documento, un "dominio de unión al antígeno de TCR no natural" se refiere a un dominio de unión unido operativamente a una región constante de TCR o una cadena CD3z que es quimérica y no natural con respecto a un TCR que está presente en la naturaleza. . Dicho de otra manera, el dominio de unión al antígeno de TCR que no se produce naturalmente se "modifica" mediante técnicas de biología molecular recombinante para unirse operativamente a una cadena constante de TCR o una cadena CD3z y, además, que el dominio de unión al antígeno se obtiene o deriva de una molécula que es distinto de un TCR que se encuentra en la naturaleza. Un dominio de unión a antígeno que es distinto de un TCR en la naturaleza incluye fragmentos de anticuerpos vH y vL, fragmentos de anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos quiméricos, ligandos de receptores y similares.

El término "operativamente ligado" o "funcionalmente ligado" se refiere al enlace funcional o asociación entre un primer componente y un segundo componente de manera que cada componente puede ser funcional. Por ejemplo, ligado operativamente incluye la asociación entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heterólogo que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente ligada con 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. En el contexto de dos polipéptidos que están ligados operativamente, un primer polipéptido funciona de manera independiente de cualquier enlace y el segundo polipéptido funciona como si estuviera ausente de un enlace entre los dos.

"Identidad porcentual", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, 60% de identidad, opcionalmente, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad en una región específica o, cuando no se especifica, en toda la secuencia), en comparación y alineado para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada como se mide mediante uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene al menos alrededor de 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o con mayor preferencia, sobre una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

El término "polinucleótido", "ácido nucleico" o "ácido nucleico recombinante" se refiere a polímeros de nucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN)

Una "proteína" o "polipéptido", cuyos términos se usan indistintamente en la presente, comprende una o más cadenas de bloques de construcción químicos denominados aminoácidos que se ligan mediante enlaces químicos denominados enlaces peptídicos.

"Refractario" como se usa en este documento se refiere a una enfermedad, por ejemplo, cáncer, que no responde a un tratamiento. En realizaciones, un cáncer refractario puede

ser resistente a un tratamiento antes o al comienzo del tratamiento. En otras realizaciones, el cáncer refractario puede volverse resistente durante un tratamiento. Un cáncer refractario también se llama cáncer resistente.

"Recaída", como se usa en este documento, se refiere al regreso de una enfermedad (por ejemplo, cáncer) o los signos y síntomas de una enfermedad como el cáncer después de un período de mejoría, por ejemplo, después del tratamiento previo de una terapia, por ejemplo, cancer terapia

Rangos: a lo largo de esta descripción, se pueden presentar varios aspectos de la invención en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención.

El término "vector retroviral" o "vector retroviral" se refiere a un vector derivado de al menos una parte de un genoma de retrovirus. Los ejemplos de vector retroviral incluyen MSCVneo, MSCV-pac (o MSCV-puro), MSCV-hygro disponibles en Addgene o Clontech. Otro ejemplo de vector de retrovirus es MSCV-Bgl2-AvrII-Bam-EcoR1-Xho-BstB1-Mlu-Sal-ClaI.103 (SEQ ID NO: 131).

El término "transposón de la bella durmiente" o "vector de transposón de la bella durmiente" se refiere a un vector derivado de al menos una parte del genoma del transposón de la bella durmiente. Un ejemplo de un vector de transposón de la bella durmiente es pSBbi-Pur (SEQ ID NO: 133). Otros ejemplos de vectores de transposones de la bella durmiente que codifican un SIR se proporcionan en SEQ ID NO: 134 y SEQ ID NO: 135.

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 liviana y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, en donde las regiones variables de la cadena pesada están ligadas contiguamente, por ejemplo, a través de un ligador sintético, por ejemplo, un ligador de polipéptido flexible corto, y capaz de expresarse como un polipéptido monocatenario, y en donde el scFv retiene la especificidad del anticuerpo intacto del cual se deriva. A menos que se especifique, como se usa en la presente, un scFv puede tener las regiones variables de vL y vH en cualquier orden, por ejemplo, con respecto a los extremos de terminal N y terminal C del polipéptido, el scFv puede comprender vL-ligador-vH o puede comprender vH-ligador-vL. En esta invención, un scFv también se describe como vL-Gly-Ser-ligador-vH. Por ejemplo, FMC63-vL-Gly-Ser-Ligador-FMC63-vH se refiere a un scFv que contiene los fragmentos vL y vH del anticuerpo monoclonal FMC63 enlazados a través de un enlazador que consta de residuos Gly y Ser. Alternativamente, un scFv también se describe como (vL + vH). Por ejemplo, FMC6- (vL + vH) se refiere a un scFv que contiene los fragmentos vL y vH del anticuerpo FMC63 unidos mediante un enlazador en el que el fragmento vL se encuentra en el N-terminal.

El término "dominio de señalización" se refiere a la región funcional de una proteína que transmite información dentro de la célula para regular la actividad celular a través de vías de señalización definidas mediante la generación de segundos mensajeros o que funcionan como efectores que responden a dichos mensajeros.

El término "Receptor Inmunológico Sintético" o alternativamente un "SIR" se refiere a un polipéptido, típicamente dos polipéptidos (por ejemplo, Un heterodímero u homodímero) en algunas

formas de realización, que cuando se expresa en una célula efectora, proporciona la célula especificidad para una célula diana, típicamente una célula cancerosa, y con generación de señal intracelular. Los SIR se han descrito en PCT / US17 / 64379. En una realización típica, un SIR comprende uno o más dominios de unión a antígeno (por ejemplo, Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un ligando o un receptor) que se unen a antígenos o ligando afines como se describe en este documento, y se unen a uno o más receptores de células T cadenas o regiones constantes a través de un enlazador opcional. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos es contiguo entre sí. En algunas realizaciones, un SIR comprende dos o más conjuntos de dos o más polipéptidos. Los polipéptidos de cada conjunto de SIR son contiguos entre sí (unidad de polipéptido funcional 1) pero no son contiguos con los polipéptidos del otro conjunto (unidad de polipéptido funcional 2). En algunos aspectos, las cadenas (o regiones) constantes del receptor de linfocitos T del SIR se eligen de la cadena constante del receptor de linfocitos T humanos alfa (TCR-alfa o TCR α o TCR α o hTCR-alfa o hTCR α o hTCR α o C α), receptor de linfocitos T humanos beta1 (TCR-beta1 o TCR β 1 o TCR β 1 o hTCR-beta1 o hTCR β 1 o hTCR β 1 o C β 1), receptor de linfocitos T humanos beta 2 (TCR-beta2 o TCR β 2 o TCR β 2 o hTCR-beta2 o hTCR β 2 o hTCR β 2 o C β 2 también denominado TCR-beta, TCR β o TCR β o C β), receptor de linfocitos pre-T humanos alfa ((preTCR-alfa o preTCR α o preTCR α o preC α), receptor de linfocitos T humanos gamma (TCR-gamma o TCR γ o TCR γ o hTCR-gamma o hTCR γ o hTCR γ o hTCR γ 1 o hTCRgamma1, o C γ), o receptor de linfocitos T humanos delta (TCR-delta o TCR δ o TCR δ o hTCR-delta o hTCR δ o hTCR δ o C δ). En algunas formas de realización, las cadenas constantes de TCR de SIR están codificadas por sus secuencias de nucleótidos de tipo silvestre, mientras que en otros aspectos las cadenas constantes de TCR de SIR están codificadas por las secuencias de nucleótidos que no son de tipo silvestre. En algunas formas de realización, las cadenas constantes de TCR de SIR están codificadas por sus secuencias de codones optimizados. En algunas formas de realización, las cadenas constantes de TCR de SIR codifican las secuencias de polipéptidos de tipo silvestre, mientras que en otras formas de realización, las cadenas constantes de TCR de SIR codifican para polipéptidos que portan una o más mutaciones. En algunas formas de realización, las cadenas constantes de TCR de SIR están codificadas por sus secuencias de codones optimizados que portan una o más mutaciones. Un SIR que comprende un dominio de fijación al antígeno (por ejemplo, un scFv o vHH) que se dirige a un generador de tumor específico "X", como los descritos en la presente, también se conoce como X-SIR o XSIR. Por ejemplo, un SIR que comprende un dominio de fijación al antígeno que se dirige a CD19 se denomina CD19-SIR o CD19SIR. La cadena/dominio constante de TCR de un SIR puede derivarse de la misma especie en la que finalmente se utilizará el SIR. Por ejemplo, para su uso en humanos, puede ser beneficioso que la cadena constante de TCR del SIR se derive o comprenda de cadenas constantes de TCR humano. Sin embargo, en algunos casos, es beneficioso que la cadena constante de TCR se derive de la misma especie en la que finalmente se usará el SIR, pero se modificará para transportar sustituciones de aminoácidos que mejoren la expresión de las cadenas constantes de TCR. Por ejemplo, para su uso en humanos, puede ser beneficioso que la cadena constante de TCR del SIR se derive o comprenda de cadenas constantes de TCR humano o esté compuesta por ellas, pero en donde ciertos aminoácidos se reemplazan por los aminoácidos correspondientes de las cadenas constantes de TCR murino. Dichas cadenas constantes de TCR murinizadas proporcionan una mayor expresión del SIR. Las secuencias de ácido nucleico de cadenas

constantes de TCR ejemplares se proporcionan en SEQ ID NO: 39-64 (Tabla 5). Las secuencias de aminoácidos de cadenas constantes de TCR ejemplares se proporcionan en SEQ ID NO: 4038-4063 (Tabla 5). El SIR, o la porción funcional de este, puede incluir aminoácidos adicionales en el terminal amino o carboxilo, o en ambos terminales, cuyos aminoácidos adicionales no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del TCR o dominio de fijación al antígeno que forman el SIR. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica del SIR o la porción funcional, por ejemplo, reconocer células diana, detectar cáncer, tratar o prevenir cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales mejoran la actividad biológica en comparación a la actividad biológica del SIR parental.

El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la fijación de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando cognado (o antígeno diana), lo que media así un evento de transducción de señal, tal como, entre otros, transducción de señales a través del TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas.

El término "proteínas de fusión del receptor TCR o TFP" se refiere a una plataforma CAR de próxima generación tal como se describe en WO 2016/187349 A1, que se incorpora en la presente por referencia. En una forma de realización, un TFP comprende una porción de anticuerpo que se fija específicamente a un antígeno diana fusionado a una cadena de TCR tal como CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α o TCR β . En el documento WO 2017/070608 A1, que se incorpora aquí como referencia, se proporcionan cadenas de TCR ejemplares que se pueden usar en la construcción de TFP. Un TFP que incorpora la cadena CD3 ϵ se denomina CD3 ϵ TFP. Un TFP que incorpora la cadena CD3 γ se denomina CD3 γ TFP. Un TFP que incorpora la cadena CD3 δ se denomina CD3 δ TFP. El TFP que incorpora las cadenas CD3 ϵ , CD3 γ o CD3 δ se denomina colectivamente CD3 $\epsilon/\gamma/\delta$ TFP. TFP ejemplares que incorporan el dominio de unión a antígeno BCMA-Am06-HL que se dirige a BCMA descrito en esta descripción y que coexpresan un módulo accesorio que codifica NEMO-K277A se proporcionan en SEQ ID NO: 4384-4387 (Tabla 6). En la Tabla 7 se proporcionan ejemplos de TFP que incorporan diferentes dominios de unión a antígeno descritos en esta divulgación y que coexpresan un módulo accesorio que codifica NEMO-K277A. Las SEQ ID NOs, los dominios de unión a antígeno y los antígenos diana de estas TFP se pueden determinar consultando la Tabla 6 ya que el orden de los diferentes constructos (es decir, clase CAR) enumerados en la Tabla 7 es el mismo que el orden de los constructos (es decir, clase CAR) enumerados en el Cuadro 6. El módulo accesorio que codifica NEMO-K277A es opcional. Los TFP con los dominios de fijación al antígeno (es decir, fragmentos vL y vH, ligandos y receptores, etc.) descritos en la presente divulgación pueden construirse sin NEMO-K277A. Como tal, este módulo accesorio junto con la secuencia Furina-SGSG-F2A corriente arriba se puede eliminar de los TFP. De manera alternativa, el módulo accesorio que codifica NEMO-K277A se puede reemplazar por módulos accesorios que codifican otras proteínas de señalización, tales como hNEMO-K277A-deltaV249-K555, mNEMO-K270A, K13-opt, IKK2-S177E-S181E, o IKK1-S176E-S180E, y MyD88 -L265P, FKBPx2-NEMO, NEMO-L600-FKBPx2, y CMV-141, etc.

El término "molécula estimuladora" se refiere a una molécula expresada por una célula inmunitaria (por ejemplo, linfocito T, célula NK, linfocito B) que proporciona las secuencias de señalización citoplásmica que regulan la activación de la célula inmunitaria de manera estimulante para al menos algún aspecto de la vía de señalización de células inmunitarias.

El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmune (por ejemplo, cualquier mamífero domesticado o un ser humano).

Los términos "célula T" y "linfocito T" son intercambiables y se usan como sinónimos en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, células T vírgenes ("progenitores de linfocitos"), células T de memoria central, células T de memoria efectora, células T de memoria madre (Tscm), células T residentes en tejidos, células T α / β , T γ / δ células, células T derivadas de iPSC, células T sintéticas o combinaciones de las mismas.

El término "efecto terapéutico" se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por diversos medios, que incluyen, entre otros, disminución del volumen del tumor, disminución del número de células cancerosas, disminución del recuento de colonias de el agente infeccioso, la mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con una enfermedad, la prevención de la aparición de la enfermedad en primer lugar o la prevención de la recaída de la enfermedad.

"Tratamiento" y "tratar", como se usan en el presente documento, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección, así como aquellos propensos a tener la afección o aquellos en quienes se debe prevenir la afección.

El término "zeta" (o definido por el símbolo griego " ζ ") o de manera alternativa "cadena zeta", "CD3-zeta" o "TCR-zeta" se define como la proteína proporcionada como GenBank Ace. N.º BAG36664.1, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares, y un "dominio estimulador zeta" o, de manera alternativa, un "dominio estimulador CD3-zeta" o un "dominio estimulador de TCR-zeta" se define como los residuos de aminoácidos del dominio citoplásmico de la cadena zeta, o derivados funcionales de esta, que son suficientes para transmitir funcionalmente una señal inicial necesaria para la activación de los linfocitos T. En un aspecto, el dominio citoplásmico de zeta comprende los residuos 52 a 164 de GenBank Ace. N.º BAG36664.1 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares, que son ortólogos funcionales de estos. En un aspecto, el "dominio estimulante zeta" o un "dominio estimulante CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como ADN SEQ ID NO: 101 y PRT SEQ ID NO: 4100.

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden un CAR y uno o más módulos accesorios opcionales y un método para usarlos para tratar enfermedades, incluido el cáncer. Como se describe en este documento, las combinaciones específicas de CAR (**Tabla 1**) y módulos accesorios como se describe en la **Tabla 2** definen una "cadena principales" (**Tabla 2**).

Tabla 1: Arquitecturas CAR. Los CAR de primera generación (CAR1 convencional o CAR I) tienen un dominio específico de antígeno (ASD), un dominio de señalización intracelular (ISD) (por ejemplo, CD3z) y ningún dominio coestimulador. Las proteínas de fusión de TCR (TFP) son CAR de próxima generación que se describen en el documento WO 2016/187349 A1 pero se asemejan al CAR1 convencional por tener un dominio específico de antígeno (ASD) y un dominio de señalización intracelular. Los CAR de segunda generación (CAR 2 convencional o CAR II) tienen un dominio específico de antígeno (ASD), un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB o CD28) y un dominio de señalización intracelular (ISD) (por ejemplo, CD3z). Los CAR de tercera generación (CAR 3 convencional o CAR III) tienen un dominio específico de antígeno (ASD), dos dominios coestimuladores

(por ejemplo, 41BB y CD28) y un dominio de señalización intracelular (ISD) (por ejemplo, CD3z). Los AbTCR son receptores de cadena de duelo y se han descrito en PCT / US2016 / 058305. Los cTCR son receptores de cadena sencilla, de una cadena y media o de doble cadena que consisten en un dominio de unión a antígeno derivado de un fragmento vL y vH que se fusionan con una cadena constante de TCR y dan como resultado la activación de la señalización de las células T. Los receptores inmunes sintéticos son cTCR de próxima generación y se describen en los documentos US 62 / 429,597 y PCT / US017 / 064379. Los SIR pueden ser receptores de cadena sencilla, de una cadena y media o de doble cadena que constan de uno o más dominios de unión a antígeno que están fusionados a uno o más cadenas constantes de TCR y dan como resultado la activación de la señalización de las células T al unirse al ligando. Los zSIR se describen en esta aplicación.

Los zSIR son una nueva plataforma de receptores inmunes sintéticos (SIR) que contienen dos cadenas CD3-zeta (CD3z). Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de las cadenas CD3z que se pueden usar en la construcción de zSIR se proporcionan en las SEQ ID NOs: 67 y 71 y PRT SEQ ID NOs: 4066 y 4072. La divulgación proporciona que el fragmento vL de un anticuerpo puede unirse a una de las dos cadenas CD3z y el fragmento vH puede unirse a la otra cadena CD3z. Cuando las dos cadenas de este tipo (por ejemplo, vL-CD3z y vH-CD3z) se coexpresan en la misma célula, los fragmentos vL y vH pueden asociarse, reconocer su antígeno afín o compañero de unión y transmitir una señal de célula T. En particular, las células T que expresan tal zSIR cuando se exponen a una línea celular que expresa el antígeno diana pueden activar la señalización de NFAT, inducir la producción de IL2 y ejercer citotoxicidad. La expresión y actividad del zSIR se puede incrementar aún más mediante la incorporación de un enlazador entre los fragmentos vL / vH y CD3z. En particular, los dominios IgCL e IgCH derivados de anticuerpos sirven como enlazadores útiles entre los fragmentos vL / vH y CD3z. En las SEQ ID NO: 4004 a 4037 se proporcionan enlazadores ejemplares que pueden usarse en la construcción de zSIR (Tabla 5). En la Figura 1 se proporcionan ejemplos esquemáticos de zSIR contemplados por la divulgación.

Por ejemplo, zSIR1, el fragmento vL de un scFV se une a un CD3z-ECD-TM-CP (dominio extracelular, transmembrana y citoplasmático) y el fragmento vH se une a un segundo CD3zECDTMCP. Se proporciona un ejemplo de zSIR1 en SEQ ID NO: 425. En zSIR2, un ASD (por ejemplo, un fragmento scFV) se une a un CD3zECDTMCP (dominio extracelular, transmembrana y citoplasmático) y el segundo ASD se une a un segundo CD3zECDTMCP. Se proporciona un zSIR2 ejemplar en SEQ ID NO: 3961. Los dos ASD pueden dirigirse al mismo o diferentes antígenos o diferentes epítomos del mismo antígeno. Un ejemplo de zSIR2 en el que los dos ASD se dirigen a dos antígenos diferentes se proporciona en SEQ ID NO: 3962. Un ejemplo de zSIR2 en el que los dos ASD apuntan a dos epítomos de los mismos antígenos se proporciona en SEQ ID NO: 3961. En zSIR3, el vL de un fragmento de un scFV se une a un CD3zECDTMCP (dominio extracelular, transmembrana y citoplasmático) a través del enlazador cL (SEQ ID NO: 28 y 4027) derivado de una inmunoglobulina y el fragmento vH se une a un segundo CD3zECDTMCP mediante un enlazador CH1 (SEQ ID NOs: 29 y 4028). Un ejemplo de zSIR3 es CD8-hCD19-EUK5-13-vL-IgCL-Bam-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-Bst-hCD19-EUK5-13-vH-IgG1-CH1-KPN-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-Xba-PAC (SEQ ID NO: 3955). Otros enlazadores que se pueden utilizar en la construcción de un zSIR se enumeran en la **Tabla 5**.

En otra realización, también se incorpora un dominio coestimulador en la(s) cadena(s) CD3z de un zSIR. Los dominios coestimuladores ejemplares incluyen dominios coestimuladores de 41BB (SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 4068) y CD28 (SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 4067). Las cadenas CD3z que contienen 41BB (BB) (ver, esquema "C", arriba) y CD28 (ver, esquema "D", arriba) dominios coestimuladores se presentan en SEQ ID NO (DNA): 76-79 y SEQ ID NO: (PRT): 4075-4078. CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[CD3zECDTM-28z-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH- [CD3zECDTM-28z-opt2] (SEQ ID NO (DNA): 3971 y SEQ ID NO (PRT): 7971) presenta un ejemplo de zSIR con CD3z que contiene dominios constimuladores de CD28. Un ejemplo de zSIR con CD3z que contiene dominios constimuladores 41BB se presenta mediante CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL- [CD3zECDTM-BBz-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH- [CD3zECDTM-BBz-opt2] (SEQ ID NO (DNA): 3972 y SEQ ID NO (PRT): 7972). Los zSIR 4-9 se asemejan a los zSIR 1-3 excepto la sustitución de CD3zECDTMCP con dominios CD3zECDTM-BBz o con CD3zECDTM-28z.

Tabla 1

Tabla 1 CARs ejemplares							
CAR 1	CAR 1 or CAR I (que incluye TFP)	ASD	HR	TMD	ISD		
CAR 2	CAR 2 (CAR II)	ASD	HR	TMD	CSD	ISD	
CAR 3	CAR 3 (CAR III)	ASD	HR	TMD	CSD-I	CSD-II	ISD
CAR 4	AbTCR	vL-cL	TCRD(1)	2A	vH-CH1	TCRD (II)	
CAR 5	cTCR/SIR de cadena doble	vL	TCR-C(1)	2A	vH	TCR-C (II)	
CAR 6	cTCR/SIR de cadena y media		TCR-C(1)	2A	ASD	TCR-C (II)	
CAR 7	zSIR1	vL	CD3zECD TMCP	2A	vH	CD3zECD TMCP	
CAR 8	zSIR2	ASD	CD3zECD TMCP	2A	ASD	CD3zECD TMCP	
CAR 9	zSIR3	vL-cL	CD3zECD TMCP	2A	vH-CH1	CD3zECD TMCP	
CAR 10	zSIR4	vL	CD3zECD TM-BBz	2A	vH	CD3zECD TM-BBz	
CAR 11	zSIR5	vL	CD3zECD TM-28z	2A	vH	CD3zECD TM-28z	
CAR 12	zSIR6	ASD	CD3zECD TM-BBz	2A	ASD	CD3zECD TM-BBz	
CAR 13	zSIR7	ASD	CD3zECD TM-28z	2A	ASD	CD3zECD TM-28z	
CAR 14	zSIR8	vL-cL	CD3zECD TM-BBz	2A	vH-CH1	CD3zECD TM-BBz	
CAR 15	zSIR9	vL-cL	CD3zECD TM-28z	2A	vH-CH1	CD3zECD TM-28z	

15

Tabla 2: Cadenas principales de ejemplo

Cadena principal	Componente CAR	Módulo accesorio	SEQ ID (ADN)	SEQ ID (PRT)
		NOMBRE		
Cadena principal 1	CAR I	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 2	CAR I	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 3	CAR I	tBCMA	97	4096

Cadena principal 4	CAR I	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 5	CAR II	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 6	CAR II	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 7	CAR II	tBCMA	97	4096
Cadena principal 8	CAR II	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 9	CAR III	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 10	CAR III	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 11	CAR III	tBCMA	97	4096
Cadena principal 12	CAR III	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 13	AbTCR	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 14	AbTCR	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 15	AbTCR	tBCMA	97	4096
Cadena principal 16	AbTCR	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 17	DC-cTCR/SIR	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 18	DC-cTCR/SIR	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 19	DC-cTCR/SIR	tBCMA	97	4096
Cadena principal 20	DC-cTCR/SIR	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 21	OHC-cTCR/SIR	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 22	OHC-cTCR/SIR	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 23	OHC-cTCR/SIR	tBCMA	97	4096
Cadena principal 24	OHC-cTCR/SIR	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 25	zSIR1	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 26	zSIR1	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 27	zSIR1	tBCMA	97	4096
Cadena principal 28	zSIR1	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 29	zSIR2	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 30	zSIR2	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 31	zSIR2	tBCMA	97	4096
Cadena principal 32	zSIR2	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 33	zSIR3	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 34	zSIR3	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 35	zSIR3	tBCMA	97	4096
Cadena principal 36	zSIR3	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 37	zSIR4	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 38	zSIR4	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 39	zSIR4	tBCMA	97	4096
Cadena principal 40	zSIR4	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 41	zSIR5	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 42	zSIR5	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 43	zSIR5	tBCMA	97	4096
Cadena principal 44	zSIR5	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 45	zSIR6	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 46	zSIR6	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 47	zSIR6	tBCMA	97	4096
Cadena principal 48	zSIR6	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 49	zSIR7	K13-vFLIP	108	4107

Cadena principal 50	zSIR7	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 51	zSIR7	tBCMA	97	4096
Cadena principal 52	zSIR7	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 53	zSIR8	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 54	zSIR8	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 55	zSIR8	tBCMA	97	4096
Cadena principal 56	zSIR8	VIH-1 Vif	118	4117
Cadena principal 57	zSIR9	K13-vFLIP	108	4107
Cadena principal 58	zSIR9	FKBPX2-K13	113	4112
Cadena principal 59	zSIR9	tBCMA	97	4096
Cadena principal 60	zSIR9	VIH-1 Vif	118	4117

TABLA 3: Listado de secuencias de fragmentos vL, vH y scFv dirigidos a diferentes antígenos que se utilizan en la construcción de CAR

Objetivo de antígeno	Dominio de unión a antígeno	vL		vH		scFv	
		ADN SEQ ID	PRT SEQ ID	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID
BCMA	BCMA-Am14-HL	155	4118	229	4192	303	4266
BCMA	BCMA-Am08-HL	156	4119	230	4193	304	4267
BCMA	BCMA-Am06-HL	157	4120	231	4194	305	4268
CD19	hu-CAT18-1-HL	158	4121	232	4195	306	4269
CD19	CAT17-HL	159	4122	233	4196	307	4270
CD22	hu-HA22-1	160	4123	234	4197	308	4271
CD19	CD19-DART1	161	4124	235	4198	309	4272
CD20	hu-Ubli-1-v4	162	4125	236	4199	310	4273
Integrina B7	Hu-IntB7-MMG49	163	4126	237	4200	311	4274
BCMA	BCMA-BB-CAR02	164	4127	238	4201	312	4275
Her2	Her2-169	165	4128	239	4202	313	4276
Her2	Her2-XMT-1520	166	4129	240	4203	314	4277
Her2	Her2-XMT-1518	167	4130	241	4204	315	4278
Her2	Her2-huMab4D5-D98W	168	4131	242	4205	316	4279
TSHR	TSHR-hu-3BD10	169	4132	243	4206	317	4280
PSMA	PSMA-83A12-HL-AM	170	4133	244	4207	318	4281
PSMA	PSMA-76-HL-AM	171	4134	245	4208	319	4282
PSMA	hu106mPSMA-4-HL	172	4135	246	4209	320	4283
MSLN	MSLN-3-HL-AM	173	4136	247	4210	321	4284
MSLN	MSLN-5-HL	174	4137	248	4211	322	4285
EGFRviii	EGFRviii-2-AM-HL	175	4138	249	4212	323	4286
EGFRviii	EGFRviii-H2M1863N2-HL	176	4139	250	4213	324	4287
EGFRviii	EGFRviii-H2M1915N-HL	177	4140	251	4214	325	4288
EGFRviii	EGFRviii-131-2	178	4141	252	4215	326	4289
DLL3	DLL3-AM6-HL	179	4142	253	4216	327	4290

		vL		vH		scFv	
Objetivo de antígeno	Dominio de unión a antígeno	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID
DLL3	DLL3-AM14-HL	180	4143	254	4217	328	4291
Nectin4	Nectin4-66-HL	181	4144	255	4218	329	4292
MSLN	MSLN-237-HL	182	4145	256	4219	330	4293
MSLN	MSLN-HuAM15	183	4146	257	4220	331	4294
MSLN	MSLN76923-HL	184	4147	258	4221	332	4295
Receptor de prolactina	PRLR-CN	185	4148	259	4222	333	4296
Muc17	Muc17-11-CN	186	4149	260	4223	334	4297
CD19	CD19-AM1	187	4150	261	4224	335	4298
CD19	CD19-9B7	188	4151	262	4225	336	4299
CD20	CD20-HL	189	4152	263	4226	337	4300
CD70	CD70-HL-AM13	190	4153	264	4227	338	4301
CDH19	CDH19-USC1-HLv4	191	4154	265	4228	339	4302
CDH19	CDH19-USC2-HL	192	4155	266	4229	340	4303
CD16ORF54	C16ORF54-USC1-v4	193	4156	267	4230	341	4304
VISTA	huVISTA-USC1-v4	194	4157	268	4231	342	4305
VISTA	huVISTA-JJ-USC2-v4	195	4158	269	4232	343	4306
GPC3	GPC3-USC1-HL-V4	196	4159	270	4233	344	4307
GPC3	GPC3-USC2-HL-V4	197	4160	271	4234	345	4308
PRLR	PRLR-USC2-HL-V4	198	4161	272	4235	346	4309
Muc5Ac	Muc5Ac-USC1-HL-V4	199	4162	273	4236	347	4310
FCRH5	FCRH5-USC1-HL-V4	200	4163	274	4237	348	4311
LYPD1	LYPD1-HL-V4	201	4164	275	4238	349	4312
EMR2	EMR2-USC1-V4	202	4165	276	4239	350	4313
EMR2	EMR2-USC2-V4	203	4166	277	4240	351	4314
EMR2	mEMR2-USC3-V4	204	4167	278	4241	352	4315
gpNMB	m-gPNMB-USC1-HL-v4	205	4168	279	4242	353	4316
RNF43	RNF43-USC1-HL4	206	4169	280	4243	354	4317
RNF43	RNF43-USC2-HL4	207	4170	281	4244	355	4318
CD44v6	CD44v6-USC1-HL4	208	4171	282	4245	356	4319
Robo4	Robo4-USC1	209	4172	283	4246	357	4320
CEA	CEA-USC1-HL4	210	4173	284	4247	358	4321
Her3	Her3-USC1-HL4	211	4174	285	4248	359	4322
FOLR1	FOLR1-USC1-HL4	212	4175	286	4249	360	4323
FOLR1	FOLR1-USC2-HL4	213	4176	287	4250	361	4324
CLDN6	CLDN6-USC1-LH4	214	4177	288	4251	362	4325

		vL		vH		scFv	
Objetivo de antígeno	Dominio de unión a antígeno	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID
CLDN6	CLDN6-USC2-LH4	215	4178	289	4252	363	4326
MMP16	hMMP16-USC1-LH4	216	4179	290	4253	364	4327
UPK1B	hUPK1B-USC1-LH4	217	4180	291	4254	365	4328
UPK1B	hUPK1B-USC2-LH4	218	4181	292	4255	366	4329
BMPR1B	hBMPR1B-USC1-LH4	219	4182	293	4256	367	4330
BMPR1B	hBMPR1B-USC2-LH4	220	4183	294	4257	368	4331
Ly6E	Ly6E-USC1-HL4	221	4184	295	4258	369	4332
STEAP1	STEAP1-USC1-HL4	222	4185	296	4259	370	4333
CD79b	CD79b-USC1-LH4	223	4186	297	4260	371	4334
WISP1	hu-UISP1-USC1-LH4	224	4187	298	4261	372	4335
WISP1	hu-UISP1-USC2-LH4	225	4188	299	4262	373	4336
SLC34A2	huMX35-LH4	226	4189	300	4263	374	4337
CD19	hu-CD19-USC1-LH4	227	4190	301	4264	375	4338
CD22	CD22-HA22	8000	9631	8031	9662	8062	9693
STEAP1	STEAP1-hu120	8001	9632	8032	9663	8063	9694
Liv1	hLiv1-mAb2	8002	9633	8033	9664	8064	9695
Nectin4	hu-Nectin4-mAb1	8003	9634	8034	9665	8065	9696
Cripto	hu-Cripto-L1H2	8004	9635	8035	9666	8066	9697
gpA33	hu-gpA33	8005	9636	8036	9667	8067	9698
ROR1	ROR1-DART4	8006	9637	8037	9668	8068	9699
BCMA	BCMA-FS	8007	9638	8038	9669	8069	9700
BCMA	BCMA-PC	8008	9639	8039	9670	8070	9701
BCMA	BCMA-AJ	8009	9640	8040	9671	8071	9702
BCMA	BCMA-NM	8010	9641	8041	9672	8072	9703
BCMA	BCMA-TS	8011	9642	8042	9673	8073	9704
BCMA	BCMA-PP	8012	9643	8043	9674	8074	9705
BCMA	BCMA-RD	8013	9644	8044	9675	8075	9706
BCMA	BCMA-BB-CAR02	8014	9645	8045	9676	8076	9707
CLL1	CLL1-24C8	8015	9646	8046	9677	8077	9708
CLL1	CLL1-24C1	8016	9647	8047	9678	8078	9709
FLT3	FLT3-10E3	8017	9648	8048	9679	8079	9710
FLT3	FLT3-8B5	8018	9649	8049	9680	8080	9711
IL1RAP	IL1RAP-IAPB57	8019	9650	8050	9681	8081	9712
IL1RAP	IL1RAP-IAPB63	8020	9651	8051	9682	8082	9713
IL1RAP	hu-IL1RAP-CANO4	8021	9652	8052	9683	8083	9714
MSLN	MSLN-7D9-v3	8022	9653	8053	9684	8084	9715
MSLN	MSLN-hu22A10	8023	9654	8054	9685	8085	9716
CD19	hu-Bu13	8024	9655	8055	9686	8086	9717

		vL		vH		scFv	
Objetivo de antígeno	Dominio de unión a antígeno	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID
BST1	hu-BST1-A1	8025	9656	8056	9687	8087	9718
BST1	hu-BST1-A2	8026	9657	8057	9688	8088	9719
BST1	hu-BST1-A3	8027	9658	8058	9689	8089	9720
Her2	Her2-XMT-1519	8028	9659	8059	9690	8090	9721
Her2	Her2-XMT-1517	8029	9660	8060	9691	8091	9722
CD133	CD133-RW03	11300	11460	11304	11464	11308	11468
CD133	CD133-W6B3H10	11301	11461	11305	11465	11309	11469
CD133	CD133-293AC1C3B9	11302	11462	11306	11466	11310	11470
IL113Ra2	hu-IL13Ra2-mAb47	12642	14386	12673	14417	12704	14448
CD22	CD22-INO	12643	14387	12674	14418	12705	14449
CD22	CD22-CELL4	12644	14388	12675	14419	12706	14450
CD22	CD22-CELL13	12645	14389	12676	14420	12707	14451
CD22	CD22-CELL7	12646	14390	12677	14421	12708	14452
CD22	CD22-VM1011	12647	14391	12678	14422	12709	14453
CD22	CD22-RAB-4120	12648	14392	12679	14423	12710	14454
CD22	CD22-Med-12C5-HL	12649	14393	12680	14424	12711	14455
CD22	CD22-Med-19A3	12650	14394	12681	14425	12712	14456
CD22	CD22-Med-16F7	12651	14395	12682	14426	12713	14457
CD22	hu-RFB4	12652	14396	12683	14427	12714	14458
BCMA	BCMA-mJ22-9	12653	14397	12684	14428	12715	14459
BCMA	BCMA-huJ22-10	12654	14398	12685	14429	12716	14460
CD22	CD22-hu-HA22-2	12655	14399	12686	14430	12717	14461
CD19	huCD19-USC3	12656	14400	12687	14431	12718	14462
CD22	BCMA-hu72	12657	14401	12688	14432	12719	14463
MPL	hu-161-3	12658	14402	12689	14433	12720	14464
BAFF-R	hu-BAFFR-USC90	12659	14403	12690	14434	12721	14465
BAFF-R	hu-BAFFR-USC55	12660	14404	12691	14435	12722	14466
BAFF-R	hu-BAFFR-MOR6654	12661	14405	12692	14436	12723	14467
CD19	CD19-hu-mROO5-1	12662	14406	12693	14437	12724	14468
CD22	CD22-h10F4v2	12663	14407	12694	14438	12725	14469
CD22	CD22-HA22	12664	14408	12695	14439	12726	14470
MPL	hu-161-2	12665	14409	12696	14440	12727	14471
MSLN	MSLN-hu22A10	12666	14410	12697	14441	12728	14472
MSLN	MSLN-7D9-HL	12667	14411	12698	14442	12729	14473
MSLN	MSLN-5	12668	14412	12699	14443	12730	14474
BCMA	BCMA-huC13-F12	12669	14413	12700	14444	12731	14475
BCMA	BCMA-huC12A3-L3H3	12670	14414	12701	14445	12732	14476
BCMA	BCMA-J6M0	12671	14415	12702	14446	12733	14477

TABLA 4: LISTADO DE SECUENCIAS DE VARIOS CDR de REGIONES vL y vH QUE PERTENEN A DIFERENTES DOMINIOS DE VINCULACIÓN DE ANTÍGENOS DIRIGIDOS A DIFERENTES ANTÍGENOS

Objetivo de antígeno	Dominio de unión a antígeno	vL- CDR1	vL- CDR2	vL- CDR3	vH- CDR1	vH- CDR2	vH- CDR3
BCMA	BCMA-Am14-HL	11961	12068	12175	12282	12389	12497
BCMA	BCMA-Am08-HL	11962	12069	12176	12283	12390	12498
BCMA	BCMA-Am06-HL	11963	12070	12177	12284	12391	12499
CD19	hu-CAT18-1-HL	11964	12071	12178	12285	12392	12500
CD19	CAT17-HL	11965	12072	12179	12286	12393	12501
CD22	hu-HA22-1	11966	12073	12180	12287	12394	12502
CD19	CD19-DART1	11967	12074	12181	12288	12395	12503
CD20	hu-Ubli-1-v4	11968	12075	12182	12289	12396	12504
Integrina B7	Hu-IntB7-MMG49	11969	12076	12183	12290	12397	12505
BCMA	BCMA-BB-CAR02	11970	12077	12184	12291	12398	12506
Her2	Her2-169	11971	12078	12185	12292	12399	12507
Her2	Her2-XMT-1520	11972	12079	12186	12293	12400	12508
Her2	Her2-XMT-1518	11973	12080	12187	12294	12401	12509
Her2	Her2-huMab4D5-D98W	11974	12081	12188	12295	12402	12510
TSHR	TSHR-hu-3BD10	11975	12082	12189	12296	12403	12511
PSMA	PSMA-83A12-HL-AM	11976	12083	12190	12297	12404	12512
PSMA	PSMA-76-HL-AM	11977	12084	12191	12298	12405	12513
PSMA	hu106mPSMA-4-HL	11978	12085	12192	12299	12406	12514
MSLN	MSLN-3-HL-AM	11979	12086	12193	12300	12407	12515
MSLN	MSLN-5-HL	11980	12087	12194	12301	12408	12516
EGFRviii	EGFRviii-2-AM-HL	11981	12088	12195	12302	12409	12517
EGFRviii	EGFRviii-H2M1863N2-HL	11982	12089	12196	12303	12410	12518
EGFRviii	EGFRviii-H2M1915N-HL	11983	12090	12197	12304	12411	12519
EGFRviii	EGFRviii-131-2	11984	12091	12198	12305	12412	12520
DLL3	DLL3-AM6-HL	11985	12092	12199	12306	12413	12521
DLL3	DLL3-AM14-HL	11986	12093	12200	12307	12414	12522
Nectin4	Nectin4-66-HL	11987	12094	12201	12308	12415	12523
MSLN	MSLN-237-HL	11988	12095	12202	12309	12416	12524
MSLN	MSLN-HuAM15	11989	12096	12203	12310	12417	12525
MSLN	MSLN76923-HL	11990	12097	12204	12311	12418	12526

Receptor de prolactina	PRLR-CN	11991	12098	12205	12312	12419	12527
Muc17	Muc17-11-CN	11992	12099	12206	12313	12420	12528
CD19	CD19-AM1	11993	12100	12207	12314	12421	12529
CD19	CD19-9B7	11994	12101	12208	12315	12422	12530
CD20	CD20-HL	11995	12102	12209	12316	12423	12531
CD70	CD70-HL-AM13	11996	12103	12210	12317	12424	12532
CDH19	CDH19-USC1-HLv4	11997	12104	12211	12318	12425	12533
CDH19	CDH19-USC2-HL	11998	12105	12212	12319	12426	12534
CD16ORF54	C16ORF54-USC1-v4	11999	12106	12213	12320	12427	12535
VISTA	huVISTA-USC1-v4	12000	12107	12214	12321	12428	12536
VISTA	huVISTA-JJ-USC2-v4	12001	12108	12215	12322	12429	12537
GPC3	GPC3-USC1-HL-V4	12002	12109	12216	12323	12430	12538
GPC3	GPC3-USC2-HL-V4	12003	12110	12217	12324	12431	12539
PRLR	PRLR-USC2-HL-V4	12004	12111	12218	12325	12432	12540
Muc5Ac	Muc5Ac-USC1-HL-V4	12005	12112	12219	12326	12433	12541
FCRH5	FCRH5-USC1-HL-V4	12006	12113	12220	12327	12434	12542
LYPD1	LYPD1-HL-V4	12007	12114	12221	12328	12435	12543
EMR2	EMR2-USC1-V4	12008	12115	12222	12329	12436	12544
EMR2	EMR2-USC2-V4	12009	12116	12223	12330	12437	12545
EMR2	mEMR2-USC3-V4	12010	12117	12224	12331	12438	12546
gpNMB	m-gPNMB-USC1-HL-v4	12011	12118	12225	12332	12439	12547
RNF43	RNF43-USC1-HL4	12012	12119	12226	12333	12440	12548
RNF43	RNF43-USC2-HL4	12013	12120	12227	12334	12441	12549
CD44v6	CD44v6-USC1-HL4	12014	12121	12228	12335	12442	12550
Robo4	Robo4-USC1	12015	12122	12229	12336	12443	12551
CEA	CEA-USC1-HL4	12016	12123	12230	12337	12444	12552
Her3	Her3-USC1-HL4	12017	12124	12231	12338	12445	12553
FOLR1	FOLR1-USC1-HL4	12018	12125	12232	12339	12446	12554
FOLR1	FOLR1-USC2-HL4	12019	12126	12233	12340	12447	12555
CLDN6	CLDN6-USC1-LH4	12020	12127	12234	12341	12448	12556
CLDN6	CLDN6-USC2-LH4	12021	12128	12235	12342	12449	12557
MMP16	hMMP16-USC-1-LH4	12022	12129	12236	12343	12450	12558
UPK1B	hUPK1B-USC1-LH4	12023	12130	12237	12344	12451	12559
UPK1B	hUPK1B-USC2-LH4	12024	12131	12238	12345	12452	12560

BMPR1B	hBMPR1B-USC1-LH4	12025	12132	12239	12346	12453	12561
BMPR1B	hBMPR1B-USC2-LH4	12026	12133	12240	12347	12454	12562
Ly6E	Ly6E-USC1-HL4	12027	12134	12241	12348	12455	12563
STEAP1	STEAP1-USC1-HL4	12028	12135	12242	12349	12456	12564
CD79b	CD79b-USC1-LH4	12029	12136	12243	12350	12457	12565
WISP1	hu-UISP1-USC1-LH4	12030	12137	12244	12351	12458	12566
WISP1	hu-UISP1-USC2-LH4	12031	12138	12245	12352	12459	12567
SLC34A2	huMX35-LH4	12032	12139	12246	12353	12460	12568
CD19	hu-CD19-USC1-LH4	12033	12140	12247	12354	12461	12569
CD22	CD22-HA22	12034	12141	12248	12355	12462	12570
STEAP1	STEAP1-hu120	12035	12142	12249	12356	12463	12571
Liv1	hLiv1-mAb2	12036	12143	12250	12357	12464	12572
Nectin4	hu-Nectin4-mAb1	12037	12144	12251	12358	12465	12573
Cripto	hu-Cripto-L1H2	12038	12145	12252	12359	12466	12574
gpA33	hu-gpA33	12039	12146	12253	12360	12467	12575
ROR1	ROR1-DART4	12040	12147	12254	12361	12468	12576
BCMA	BCMA-FS	12041	12148	12255	12362	12469	12577
BCMA	BCMA-PC	12042	12149	12256	12363	12470	12578
BCMA	BCMA-AJ	12043	12150	12257	12364	12471	12579
BCMA	BCMA-NM	12044	12151	12258	12365	12472	12580
BCMA	BCMA-TS	12045	12152	12259	12366	12473	12581
BCMA	BCMA-PP	12046	12153	12260	12367	12474	12582
BCMA	BCMA-RD	12047	12154	12261	12368	12475	12583
BCMA	BCMA-BB-CAR02	12048	12155	12262	12369	12476	12584
CLL1	CLL1-24C8	12049	12156	12263	12370	12477	12585
CLL1	CLL1-24C1	12050	12157	12264	12371	12478	12586
FLT3	FLT3-10E3	12051	12158	12265	12372	12479	12587
FLT3	FLT3-8B5	12052	12159	12266	12373	12480	12588
IL1RAP	IL1RAP-IAPB57	12053	12160	12267	12374	12481	12589
IL1RAP	IL1RAP-IAPB63	12054	12161	12268	12375	12482	12590
IL1RAP	hu-IL1RAP-CANO4	12055	12162	12269	12376	12483	12591
MSLN	MSLN-7D9-v3	12056	12163	12270	12377	12484	12592
MSLN	MSLN-hu22A10	12057	12164	12271	12378	12485	12593
CD19	hu-Bu13	12058	12165	12272	12379	12486	12594
BST1	hu-BST1-A1	12059	12166	12273	12380	12487	12595
BST1	hu-BST1-A2	12060	12167	12274	12381	12488	12596
BST1	hu-BST1-A3	12061	12168	12275	12382	12489	12597

Her2	Her2-XMT-1519	12062	12169	12276	12383	12490	12598
Her2	Her2-XMT-1517	12063	12170	12277	12384	12491	12599
CD133	CD133-RW03	12064	12171	12278	12385	12492	12600
CD133	CD133-W6B3H10	12065	12172	12279	12386	12493	12601
CD133	CD133-293AC1C3B9	12066	12173	12280	12387	12494	12602
IL113Ra2	hu-IL13Ra2-mAb47	16126	16157	16188	16219	16250	16281
CD22	CD22-INO	16127	16158	16189	16220	16251	16282
CD22	CD22-CELL4	16128	16159	16190	16221	16252	16283
CD22	CD22-CELL13	16129	16160	16191	16222	16253	16284
CD22	CD22-CELL7	16130	16161	16192	16223	16254	16285
CD22	CD22-VM1011	16131	16162	16193	16224	16255	16286
CD22	CD22-RAB-4120	16132	16163	16194	16225	16256	16287
CD22	CD22-Med-12C5-HL	16133	16164	16195	16226	16257	16288
CD22	CD22-Med-19A3	16134	16165	16196	16227	16258	16289
CD22	CD22-Med-16F7	16135	16166	16197	16228	16259	16290
CD22	hu-RFB4	16136	16167	16198	16229	16260	16291
BCMA	BCMA-mJ22-9	16137	16168	16199	16230	16261	16292
BCMA	BCMA-huJ22-10	16138	16169	16200	16231	16262	16293
CD22	CD22-hu-HA22-2	16139	16170	16201	16232	16263	16294
CD19	huCD19-USC3	16140	16171	16202	16233	16264	16295
CD22	BCMA-hu72	16141	16172	16203	16234	16265	16296
MPL	hu-161-3	16142	16173	16204	16235	16266	16297
BAFF-R	hu-BAFFR-USC90	16143	16174	16205	16236	16267	16298
BAFF-R	hu-BAFFR-USC55	16144	16175	16206	16237	16268	16299
BAFF-R	hu-BAFFR-MOR6654	16145	16176	16207	16238	16269	16300
CD19	CD19-hu-mROO5-1	16146	16177	16208	16239	16270	16301
CD22	CD22-h10F4v2	16147	16178	16209	16240	16271	16302
CD22	CD22-HA22	16148	16179	16210	16241	16272	16303
MPL	hu-161-2	16149	16180	16211	16242	16273	16304
MSLN	MSLN-hu22A10	16150	16181	16212	16243	16274	16305
MSLN	MSLN-7D9-HL	16151	16182	16213	16244	16275	16306
MSLN	MSLN-5	16152	16183	16214	16245	16276	16307
BCMA	BCMA-huC13-F12	16153	16184	16215	16246	16277	16308
BCMA	BCMA-huC12A3-L3H3	16154	16185	16216	16247	16278	16309
BCMA	BCMA-J6M0	16155	16186	16217	16248	16279	16310

TABLA 5

COMPONENTE DEL CAR	ADN SEQ ID	PRT SEQ ID
Péptido de señal CD8	1	4000

Péptido de señal CD8	2	4001
Péptido de señal de IgH	3	4002
Péptido de señal de IgH	4	4003
(GGGGS)x3_ligador	5	4004
DDAKK_ligador	6	4005
GGSG-Streptagx2-Tag	7	4006
PG4SP-ligador	8	4007
PG4SP-v2-ligador	9	4008
E-coil-ligador	10	4009
K-coil-ligador	11	4010
EAAAK-ligador	12	4011
EAAAK-v2-ligador	13	4012
Myc-(P)-TAG	14	4013
Myc-TAG	15	4014
MYC-TAG	16	4015
MYC2-TAG	17	4016
MYC4-TAG	18	4017
V5-TAG	19	4018
HA-TAG	20	4019
HIS-TAG	21	4020
AVI-TAG-delta-GSG	22	4021
G4Sx2-TAG	23	4022
G4Sx2-TAG	24	4023
StrepTagII	25	4024
StrepTagII	26	4025
FLAG-TAG	27	4026
IgCL	28	4027
IgG1-CHI	29	4028
IgG2-0C-CHI	30	4029
IgG2-IC-CHI	31	4030
IgG3-CHI	32	4031
IgG4-CHI	33	4032
IgA1-CHI	34	4033
IgA2-CHI	35	4034
IgD-CHI	36	4035
IgE-CHI	37	4036
IgM-CHI	38	4037
hTCRa-constante-alfa_X02883.1	39	4038
hTCRa-WT	40	4039
hTCRa-CSDVP	41	4040
hTCRa-opt2	42	4041
hTCRa-T48C-opt	43	4042
hTCRa-T48C-opt1	44	4043
hTCRa-SDVP	45	4044
hTCRa-S61R	46	4045
hTCRa-SDVPR	47	4046

hTCRaECD-CD3zECDTMCP-opt2	48	4047
hTCR-b1-región constante_X00437.1	49	4048
hTCR-b2-región constante_L34740	50	4049
hTCRb-WT	51	4050
hTCRb-S57C-opt1	52	4051
hTCRb-KACIAH	53	4052
hTCRb-opt2	54	4053
hTCRb-KAIAH	55	4054
hTCRb-R79G	56	4055
hTCRbECD-CD3zECDTMCP-opt	57	4056
preTCRa_gb_U38996.1	58	4057
preTCRa	59	4058
preTCRa-del48	60	4059
hTCR-gamma_M27331.1	61	4060
hTCR-Gamma-Opt	62	4061
hTCR-Delta	63	4062
hTCR-Delta-Opt	64	4063
CD3zECDTM-opt	65	4064
CD3zCP-opt	66	4065
CD3zECDTMCP-opt	67	4066
CD28-CP-opt	68	4067
41BB-CP-opt	69	4068
CD3e-CP-opt	70	4069
CD3zECDTM-opt2	71	4070
CD3zCP-opt2	72	4071
CD3zECDTMCP-opt2	73	4072
CD28-CP-opt2	74	4073
41BB-CP-opt2	75	4074
CD3zECDTM-28z-opt	76	4075
CD3zECDTM-BBz-opt	77	4076
CD3zECDTM-28z-opt2	78	4077
CD3zECDTM-BBz-opt2	79	4078
F2A	80	4079
T2A	81	4080
T2A	82	4081
P2A	83	4082
Variante P2A	84	4083
E2A	85	4084
SGSG	86	4085
SGSG	87	4086
LUGAR DE FURINAS	88	4087
LUGAR DE FURINAS	89	4088
LUGAR DE FURINAS	90	4089
PuroR_Variant-(PAC)	91	4090
BlastR	92	4091
CNB30	93	4092

GMCSF-SP-tEGFR	94	4093
tEGFRviii	95	4094
tCD19	96	4095
tBCMA	97	4096
hCD8-Bisagra-TM	98	4097
hCD8-Bisagra-TM-BBz	99	4098
hCD8TM-Bisagra-BB	100	4099
Dominio citosólico CD3z	101	4100
Dominio citosólico CD3z	102	4101
CD28- Bisagra-TM-Dominio citosólico	103	4102
Myr-MYD88-CD40-Fv'-Fv	104	4103
IL12F	105	4104
41BB-L	106	4105
CD40L	107	4106
K13	108	4107
MC159	109	4108
cFLIP-L/MRIT-alpha	110	4109
cFLIP-p22	111	4110
FKBP-K13	112	4111
FKBPX2-K13	113	4112
HTLV1-TAX	114	4113
HTLV2-TAX	115	4114
HTLV2-TAX-RS	116	4115
icaspase-9	117	4116
VIH-1 Vif	118	4117

TABLA 6: LISTA DE SECUENCIAS DE DIFERENTES

- 5 clases de CAR según el dominio de unión al antígeno BCMA-Am06-HL. También se muestran el tipo de CAR y los módulos de accesorios. Las clases CAR 16 y 17 representan una cadena de un SIR de doble cadena y muestran actividad biológica solo cuando se coexpresan con su cadena complementaria (es decir, CAR clases 18 y 19, respectivamente). Las clases CAR 13-15 (SIR monocatenario) muestran solo una actividad débil.

Clase de CAR	SEQ ID (ADN)	SEQ ID (PRT)	NOMBRE	TIPO DE CAR	Módulo de accesorios
CAR Clase 1	377	4340	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 2	378	4341	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[preTCRa-Del48]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC

CAR Clase 3	379	4342	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SIR de una cadena y media	PAC
CAR Clase 4	380	4343	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-Myc4-[preTCRa-Del48]-F-F2A-PAC	SIR de una cadena y media	PAC
CAR Clase 5	381	4344	CD8SP-MYC-[hTCRa-T48C-opt1]-F-F2A-SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-V5-[hTCRb-S57C-opt1]-F-P2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 6	382	4345	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRb-S57C-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[hTCRa-T48C-opt]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 7	383	4346	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[hTCRb-opt2]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-[hTCRa-opt2]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 8	384	4347	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[hTCRb-opt2]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[preTCRa-Del48]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 9	385	4348	CD8SP-[hTCRb-opt2]-F-P2A-CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-Myc4-[preTCRa-Del48]-F-F2A-PAC	SIR de una cadena y media	PAC
CAR Clase 10	386	4349	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRg1-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[hTCRd-opt]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 11	387	4350	CD8SP-V5-[hTCRg1-opt]-F-P2A-CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[hTCRd-opt]-F-F2A-PAC	SIR de una cadena y media	PAC
CAR Clase 12	388	4351	CD8SP-G4Sx2-[hTCRa-S61R-opt]-F-F2A-SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-G4Sx2-[hTCRb-R79G-opt]-F-P2A-PAC	SIR de una cadena y media	PAC
CAR Clase 13	389	4352	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-[hTCRa-SDVP]-F-F2A-PAC	SIR de cadena simple	PAC
CAR Clase 14	390	4353	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-[hTCRb-KAIAH]-F-P2A-PAC	SIR de cadena simple	PAC
CAR Clase 15	391	4354	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-Myc4-[preTCRa-Del48]-F-F2A-PAC	SIR de cadena simple	PAC
CAR Clase 16	392	4355	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRb-S57C-opt]-F-P2A-PAC	Una cadena de un SIR de doble cadena	PAC

CAR Clase 17	393	4356	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRb-S57C-opt]	Una cadena de un SIR de doble cadena	
CAR Clase 18	394	4357	IgHSP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[hTCRa-T48C-opt]-F-F2A-BlastR	Una cadena de un SIR de doble cadena	
CAR Clase 19	395	4358	IgHSP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[hTCRa-T48C-opt]	Una cadena de un SIR de doble cadena	
CAR Clase 20	396	4359	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-CD8TM-BBz	CAR II	
CAR Clase 21	397	4360	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	CAR II	
CAR Clase 22	398	4361	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	CAR 1	K13 and PAC
CAR Clase 23	399	4362	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 24	400	4363	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-PG4SP-v2-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-PG4SP-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 25	401	4364	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-E-Coil-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-K-Coil-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 26	402	4365	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-EAAAK-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-EAAAK-v2-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 27	403	4366	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc4-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 28	404	4367	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Myc2-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc4-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 29	405	4368	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SIR de doble cadena	PAC
CAR Clase 30	406	4369	CD8-BCMA-Am06-HL-vL-IgCL-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-Bst-BCMA-Am06-HL-vH-IgG1-CH1-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	zSIR	PAC
CAR Clase 31	407	4370	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[hTCRbECD-Bam-CD3zECDTMCP-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-[hTCRaECD-Kpn-CD3zECDTMCP-opt2]	zSIR	

CAR Clase 32	408	4371	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[hTCRb-KAC-ECD-Bam-CD3zECDTMCP-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-[hTCRa-CSDVP-ECD-Kpn-CD3zECDTMCP-opt2]	SIR	
CAR Clase 33	409	4372	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRbECD-Bam-CD3zECDTMCP-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[hTCRaECD-Kpn-CD3zECDTM-28z-opt2]	SIR	PAC
CAR Clase 34	410	4373	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRbECD-Bam-CD3zECDTM-28z-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc-[hTCRaECD-Kpn-CD3zECDTM-28z-opt2]	SIR	
CAR Clase 35	411	4374	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRbECD-Bam-CD3zECDTMCP-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc4-[hTCRaECD-Kpn-CD3zECDTM-BBz-opt2]	SIR	
CAR Clase 36	412	4375	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-V5-[hTCRbECD-Bam-CD3zECDTM-BBz-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Myc4-[hTCRaECD-Kpn-CD3zECDTM-BBz-opt2]	SIR	
CAR Clase 37	413	4376	CD8-BCMA-Am06-HL-vL-IgCL-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-Bst-BCMA-Am06-HL-vH-IgG1-CH1-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC-DeltaWPRE	zSIR	
CAR Clase 38	414	4377	CD8SP-BCMA-Am06-HL-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	CAR I	hNEMO-K277A-Flag PAC y
CAR Clase 39	415	4378	CD8SP-BCMA-Am06-HL-(vL-vH)-CD3e-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	TFP	hNEMO-K277A-Flag PAC y
CAR Clase 40	416	4379	CD8SP-BCMA-Am06-HL-(vL-vH)-CD3d-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	TFP	hNEMO-K277A-Flag PAC y
CAR Clase 41	417	4380	CD8SP-BCMA-Am06-HL-(vL-vH)-CD3g-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	TFP	hNEMO-K277A-Flag PAC y
CAR Clase 42	418	4381	CD8SP-BCMA-Am06-HL-(vL-vH)-CD3z-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	TFP	hNEMO-K277A-Flag PAC y
CAR Clase 43	419	4382	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[IgCL-TCRg-6MD]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-[IgG1-CH1-TCRd-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	Ab-TCR	hNEMO-K277A-Flag

CAR Clase 44	420	4383	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-hNEMO-K277A	Ab-TCR	hNEMO-K277A-Flag
CAR Clase 45	421	4384	CD8SP-BCMA-Am06-HL-(vH-vL)-CD3e-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	TFP	hNEMO-K277A-Flag PAC y
CAR Clase 46	422	4385	CD8SP-BCMA-Am06-HL-(vH-vL)-CD3d-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	TFP	hNEMO-K277A-Flag PAC y
CAR Clase 47	423	4386	CD8SP-BCMA-Am06-HL-(vH-vL)-CD3g-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	TFP	hNEMO-K277A-Flag PAC y
CAR Clase 48	424	4387	CD8SP-BCMA-Am06-HL-(vH-vL)-CD3z-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-PAC	TFP	hNEMO-K277A-Flag PAC y
CAR Clase 49	425	4388	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-BCMA-Am06-HL-vH-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	zSIR	PAC
CAR Clase 50	12784	14528	CD8SP-BCMA-Am06-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-vH-[hTCRa-T48C]	SIR de doble cadena	
CAR Clase 51	12785	14529	CD8SP-BCMA-Am06-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-vH-[hTCRa-T48C]-F-F2A-K13-opt	SIR de doble cadena	K13-vFLIP
CAR Clase 52	12786	14530	CD8SP-BCMA-Am06-vL-[hTCRa-T48C]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-vH-[hTCRa-S57C]	SIR de doble cadena	
CAR Clase 53	12787	14531	CD8SP-BCMA-Am06-vL-[hTCRa-T48C]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-vH-[hTCRa-S57C]-F-P2A-K13-opt	SIR de doble cadena	K13-vFLIP

TABLA 7: LISTADO DE SECUENCIAS DE DIVERSAS CONSTRUCCIONES DE COCHES QUE CONTIENEN DIFERENTES DOMINIOS DE VINCULACIÓN DE ANTÍGENOS. EL ORDEN DE LAS DIFERENTES CONSTRUCCIONES DE COCHES ES COMO SE MUESTRA EN LA TABLA 6 PARA COCHES BASADOS EN BCMA-Am06-HL.

5

			CARs	
	Objetivo de antígeno	Dominio de unión a antígeno	SEQ ID NO (ADN)	SEQ ID NO (PRT)
1	BCMA	BCMA-Am14-HL	475-523	4438-4486
2	BCMA	BCMA-Am08-HL	426-474	4389-4437

3	BCMA	BCMA-Am06-HL	377-425;12784-12787	4340-4388;14528-14531
4	CD19	hu-CAT18-1-HL	867-915	4830-4871
5	CD19	CAT17-HL	818-866	4781-4829
6	CD22	hu-HA22-1	1112-1160	5068-5115
7	CD19	CD19-DART1	916-964	4872-4920
8	CD20	hu-Ubli-1-v4	1063-1111	5019-5067
9	Hu	Hu-IntB7-MMG49	2533-2581	6489-6537
10	BCMA	BCMA-BB-CAR02	524-572	4487-4535
11	Her2	Her2-169	2288-2336	6244-6292
12	Her2	Her2-XMT-1520	2435-2483	6391-6439
13	Her2	Her2-XMT-1518	2386-2434	6342-6390
14	Her2	Her2-huMab4D5-D98W	2337-2385	6293-6341
15	TSHR	TSHR-hu-3BD10	3611-3659	7567-7615
16	PSMA	PSMA-83A12-HL-AM	3317-3365	7273-7321
17	PSMA	PSMA-76-HL-AM	3268-3316	7224-7272
18	PSMA	hu106mPSMA-4-HL	3219-3267	7175-7223
19	MSLN	MSLN-3-HL-AM	2729-2777	6685-6733
20	MSLN	MSLN-5-HL	2778-2826	6734-6782
21	EGFRviii	EGFRviii-2-AM-HL	1651-1699	5607-5655
22	EGFRviii	EGFRviii-H2M1863N2-HL	1749-1797	5705-5753
23	EGFRviii	EGFRviii-H2M1915N-HL	1798-1846	5754-5802
24	EGFRviii	EGFRviii-131-2	1700-1748	5656-5704
25	DLL3	DLL3-AM6-HL	1553-1601	5509-5557
26	DLL3	DLL3-AM14-HL	1602-1650	5558-5606
27	Nectin 4	Nectin4-66-HL	3072-3120	7028-7076
28	MSLN	MSLN-237-HL	2827-2875	6783-6831
29	MSLN	MSLN-HuAM15	2925-2973	6881-6929
30	MSLN	MSLN76923-HL	2876-2924	6832-6880
31	PRLR	PRLR-CN	3121-3169	7077-7125
32	Muc17	Muc17-11-CN	3023-3071	6979-7027
33	CD19	CD19-AM1	769-817	4732-4780
34	CD19	CD19-9B7	720-768	4683-4731
35	CD20	CD20-HL	1014-1062	4970-5018
36	CD70	CD70-HL-AM13	1210-1258	5166-5214
37	CDH19	CDH19-USC1-HLv4	1308-1356	5264-5312
38	CDH19	CDH19-USC2-HL	1357-1405	5313-5361
39	C16ORF54	C16ORF54-USC1-v4	671-719	4634-4682
40	VISTA	huVISTA-USC1-v4	3807-3855	7763-7811
41	VISTA	huVISTA-JJ-USC2-v4	3758-3806	7714-7762
42	GPC3	GPC3-USC1-HL-V4	2141-2189	6097-6145
43	GPC3	GPC3-USC2-HL-V4	2190-2238	6146-6194
44	PRLR	PRLR-USC2-HL-V4	3170-3218	7126-7174
45	Muc5Ac	Muc5Ac-USC1-HL-V4	2974-3022	6930-6978
46	FCRH5	FCRH5-USC1-HL-V4	1994-2042	5950-5998
47	LYPD1	LYPD1-HL-V4	2631-2679	6587-6635
48	EMR2	EMR2-USC1-V4	1847-1895	5803-5851

49	EMR2	EMR2-USC2-V4	1896-1944	5852-5900
50	EMR2	mEMR2-USC3-V4	1945-1993	5901-5949
51	gPNMB	m-gPNMB-USC1-HL-v4	2239-2287	6195-6243
52	RNF43	RNF43-USC1-HL4	3366-3414	7322-7370
53	RNF43	RNF43-USC2-HL4	3415-3463	7371-7419
54	CD44v6	CD44v6-USC1-HL4	1161-1209	5117-5165
55	Robo4	Robo4-USC1	3464-3512	7420-7468
56	CEA	CEA-USC1-HL4	1406-1454	5362-5410
57	Her3	Her3-USC1-HL4	2484-2532	6440-6488
58	FOLR1	FOLR1-USC1-HL4	2043-2091	5999-6047
59	FOLR1	FOLR1-USC2-HL4	2092-2140	6048-6096
60	CLDN6	CLDN6-USC1-LH4	1455-1503	5411-5459
61	CLDN6	CLDN6-USC2-LH4	1504-1552	5460-5508
62	MMP16	hMMP16-USC-1-LH4	2680-2728	6636-6684
63	UPK1B	hUPK1B-USC1-LH4	3660-3708	7616-7664
64	UPK1B	hUPK1B-USC2-LH4	3709-3757	7665-7713
65	BMPR1B	hBMPR1B-USC1-LH4	573-621	4536-4584
66	BMPR1B	hBMPR1B-USC2-LH4	622-670	4585-4633
67	Ly6E	Ly6E-USC1-HL4	2582-2630	6538-6586
68	STEAP1	STEAP1-USC1-HL4	3513-3561	7469-7517
69	CD79b	CD79b-USC1-LH4	1259-1307	5215-5263
70	WISP1	hu-UISP1-USC1-LH4	3856-3904	7812-7860
71	WISP1	hu-UISP1-USC2-LH4	3905-3953	7861-7909
72	SLC34A2	huMX35-LH4	3562-3610	7518-7566
73	CD19	hu-CD19-USC1-LH4	965-1013	4921-4969
74	CD22	CD22-HA22	8730-8778	10361-10409
75	STEAP1	STEAP1-hu120	9563-9611	11194-11242
76	Liv1	hLiv1-mAb2	9318-9366	10949-10997
77	Nectin 4	hu-Nectin4-mAb1	9465-9513	11096-11144
78	Cripto	hu-Cripto-L1H2	8877-8925	10508-10556
79	gpA33	hu-gpA33	9024-9072	10655-10703
80	ROR1	ROR1-DART4	9514-9562	11145-11193
81	BCMA	BCMA-FS	8191-8239	9822-9870
82	BCMA	BCMA-PC	8289-8337	9920-9968
83	BCMA	BCMA-AJ	8093-8141	9724-9772
84	BCMA	BCMA-NM	8240-8288	9871-9919
85	BCMA	BCMA-TS	8436-8484	10067-10115
86	BCMA	BCMA-PP	8338-8386	9969-10017
87	BCMA	BCMA-RD	8387-8435	10018-10066
88	BCMA	BCMA-BB-CAR02	8142-8190	9773-9821
89	CLL1	CLL1-24C8	8828-8876	10459-10507
90	CLL1	CLL1-24C1	8779-8827	10410-10458
91	FLT3	FLT3-10E3	8975-9023	10606-10654
92	FLT3	FLT3-8B5	8926-8974	10557-10605
93	IL1RAP	IL1RAP-IAPB57	9171-9219	10802-10850
94	IL1RAP	IL1RAP-IAPB63	9220-9268	10851-10899

95	IL1RAP	hu-IL1RAP-CANO4	9269-9317	10900-10948
96	MSLN	MSLN-7D9-v3	9367-9415	10998-11046
97	MSLN	MSLN-hu22A10	9416-9464	11047-11095
98	CD19	hu-Bu13	8632-8680	10263-10311
99	BST1	hu-BST1-A1	8485-8533	10116-10164
100	BST1	hu-BST1-A2	8534-8582	10165-10212
101	BST1	hu-BST1-A3	8583-8631	10213-10262
102	Her2	Her2-XMT-1519	9122-9170	10753-10801
103	Her2	Her2-XMT-1517	9073-9121	10704-10752
104	CD133	CD133-RW03	11312-11360	11472-11520
105	CD133	CD133-W6B3H10	11361-11409	11521-11569
106	CD133	CD133-293AC1C3B9	11410-11458	11570-11618
107	IL13Ra2	hu-IL13Ra2-mAb47	14113-14165	15857-15909
108	CD22	CD22-INO	13424-13476	15168-15220
109	CD22	CD22-CELL4	13106-13158	14850-14902
110	CD22	CD22-CELL13	13212-13264	14956-15008
111	CD22	CD22-CELL7	13159-13211	14903-14955
112	CD22	CD22-VM1011	13689-13741	15433-15485
113	CD22	CD22-RAB-4120	13636-13688	15380-15432
114	CD22	CD22-Med-12C5-HL	13477-13529	15221-15273
115	CD22	CD22-Med-19A3	13583-13635	15327-15379
116	CD22	CD22-Med-16F7	13530-13582	15274-15326
117	CD22	hu-RFB4	14166-14218	15910-15962
118	BCMA	BCMA-mJ22-9	13053-13105	14797-14849
119	BCMA	BCMA-huJ22-10	12947-12999	14691-14743
120	CD22	CD22-hu-HA22-2	13371-13423	15115-15167
121	CD19	huCD19-USC3	14060-14112	15804-15856
122	CD22	BCMA-hu72	12788-12840	14532-14584
123	MPL	hu-161-3	13795-13847	15539-15591
124	BAFF-R	hu-BAFFR-USC90	13954-14006	15698-15750
125	BAFF-R	hu-BAFFR-USC55	13901-13953	15645-15697
126	BAFF-R	hu-BAFFR-MOR6654	13848-13900	15592-15644
127	CD19	CD19-hu-mROO5-1	14007-14059	15751-15803
128	CD22	CD22-h10F4v2	13265-13317	15009-15061
129	CD22	CD22-HA22	13318-13370	15062-15114
130	MPL	hu-161-2	13742-13794	15486-15538
131	MSLN	MSLN-hu22A10	14325-14377	16069-16021
132	MSLN	MSLN-7D9-HL	14272-14324	16016-16068
133	MSLN	MSLN-5	14219-14271	15963-16015
134	BCMA	BCMA-huC13-F12	12894-12946	14638-14690
135	BCMA	BCMA-huC12A3-L3H3	12841-12893	14585-14637
136	BCMA	BCMA-J6M0	13000-13052	14744-14796

Tabla 8. zSIR, SIR y construcciones misceláneas ejemplares

SEQ ID (ADN)	SEQ ID (PRT)	NOMBRE
3955	7955	CD8SP-hCD19-EUK5-13-vL-IgCL-Bam-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-Bst-hCD19-EUK5-13-vH-IgG1-CH1-KPN-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3956	7956	CD8-hCD19-EUK5-13-vL-IgCL-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-Bst-hCD19-EUK5-13-vH-IgG1-CH1-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3957	7957	CD8SP-hCD19-EUK5-13-vL-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-hCD19-EUK5-13-vH-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3958	7958	
3959	7959	CD8SP-FMC63-vL-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-FMC63-vH-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3960	7960	hCD19-Bu12-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Pac
3961	7961	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-CD19MM-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3962	7962	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-CD123-DART2-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3963	7963	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-CD20-2F2-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3964	7964	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-AFP-61-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3965	7965	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-CD22-h10F4v2-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3966	7966	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-hSC22-10-HL-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3967	7967	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-CD123-DART1-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3968	7968	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-WT1-Ab5-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC
3969	7969	CD8SP-CD19-USC2-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-CD19-USC2-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC
3971	7971	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[CD3zECDTM-28z-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-[CD3zECDTM-28z-opt2]
3972	7972	CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-[CD3zECDTM-BBz-opt]-F-P2A-SP-BCMA-Am06-HL-vH-[CD3zECDTM-BBz-opt2]
16311	16335	CD8SP-FMC63-BBz
16312	16336	CD8SP-MSLN-hu22A10-BBz
16313	16337	CD8SP-MSLN-7D9-HL-BBz
16314	16338	CD8SP-MSLN-5-HL-BBz
16315	16339	CD8SP-MPL-hu-161-2-BBz
16316	16340	CD8SP-BCMA-huC13-F12-BBz
16317	16341	CD8SP-huCD19-mROO5-1-BBz
16318	16342	CD8SP-huCD19-mROO5-1-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-huCD19-mROO5-1-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-K13-opt
16319	16343	CD8SP-CD22-INO-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-CD22-INO-vH-[hTCRa-T48C]-F-F2A-PAC

SEQ ID (ADN)	SEQ ID (PRT)	NOMBRE
16320	16344	CD8SP-CD22-hu-HA22-2-vL-[hTCRa-T48C]-F-P2A-SP-CD22-hu-HA22-2-vH-[hTCRa-S57C]-F-F2A-Pac
16321	16345	CD8SP-CD22-Med-12C5-HL-vH-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-CD22-Med-12C5-HL-vL-[hTCRa-T48C]-F-F2A-PAC
16322	16346	CD8SP-hu-RFB4-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-hu-RFB4-vH-[hTCRa-T48C]-F-F2A-PAC
16323	16347	CD8SP-CD22-CELL7-vH-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-CD22-CELL7-vL-[hTCRa-T48C]-F-F2A-PAC
16324	16348	CD8SP-CD22-HA22-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-CD22-HA22-vH-[hTCRa-T48C]-F-F2A-PAC
16325	16349	CD8SP-MSLN-7D9-HL-vH-[hTCRa-T48C]-F-P2A-SP-MSLN-7D9-HL-vL-[hTCRa-S57C]
16326	16350	CD8SP-MSLN-7D9-HL-vH-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-MSLN-7D9-HL-vL-[hTCRa-T48C]
16328	16351	CD8SP-huCD19-mROO5-1-(vL-vH)-CD3e-ECDTMCP-opt2-T2A-PAC
16329	16352	CD8SP-huCD19-mROO5-1-(vL-vH)-CD3d-ECDTMCP-opt2-T2A-PAC
16330	16353	CD8SP-huCD19-mROO5-1-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-huCD19-mROO5-1-vH-[hTCRa-CSDVP]
16331	16354	CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-MSLN-hu22A10-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-K13-Opt
16332	16355	CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-MSLN-hu22A10-vH-[hTCRa-CSDVP]
16333	16356	CD8SP-MSLN-7D9-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-MSLN-7D9-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-K13-opt
16334	16357	CD8SP-MSLN-7D9-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-MSLN-7D9-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]
16361	16358	CD8SP-MSLN-5-HL-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-MSLN-5-HL-vL-[hTCRb-KACIAH]
16362	16359	CD8SP-MSLN-7D9-HL-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-MSLN-7D9-HL-vL-[hTCRb-KACIAH]
16363	16360	CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-MSLN-hu22A10-vH-[hTCRb-KACIAH]

Tabla 9: Construcciones Vif ejemplares

SEQ ID (ADN)	SEQ ID (PRT)	NOMBRE
11243	11270	VIH 1-Vif
11244	11271	CD8SP-FMC63-(vL-vH)-Myc-BBz-T2A-PAC
11245	11272	CD8SP-FMC63-(vL-vH)-Myc-BBz-F-P2A-Vif-F-P2A-PAC
11246	11273	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-Vif
11247	11274	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Myc-[preTCRa-Del48]-F-F2A-Vif
11248	11275	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-Vif

SEQ ID (ADN)	SEQ ID (PRT)	NOMBRE
11249	11276	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-V5-[hTCRg1-opt]-F-P2A-SP-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Myc-[hTCRd-opt]-F-F2A-Vif
11250	11277	CD8SP-V5-[hTCRg1-opt]-F-P2A-CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Myc-[hTCRd-opt]-F-F2A-Vif
11251	11278	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-Vif
11252	11279	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-hu-CD19-USC1-LH4-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Vif
11253	11280	CD8-hu-CD19-USC1-LH4-vL-IgCL-Bam-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-Bst-hu-CD19-USC1-LH4-vH-IgG1-CH1-KPN-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-Xba-Vif
11254	11281	CD8-hu-CD19-USC1-LH4-vL-IgCL-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-Bst-hu-CD19-USC1-LH4-vH-IgG1-CH1-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-Vif
11255	11282	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-(vL-vH)-Myc-z-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-Vif
11256	11283	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-(vL-vH)-CD3e-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-Vif
11257	11284	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-(vL-vH)-CD3d-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-Vif
11258	11285	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-(vL-vH)-CD3g-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-Vif
11259	11286	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-(vL-vH)-CD3z-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-Vif
11260	11287	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-[IgCL-TCRg-6MD]-F-P2A-SP-hu-CD19-USC1-LH4-vH-[IgG1-CH1-TCRd-6MD]-F-F2A-Vif
11261	11288	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-[IgCL-TCRb-IAH-6MD]-F-P2A-SP-hu-CD19-USC1-LH4-vH-[IgG1-CH1-TCRa-SDVP-6MD]-F-F2A-Vif
11262	11289	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-(vH-vL)-CD3e-ECDTMCP-opt2-P2A-Vif
11263	11290	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-(vH-vL)-CD3d-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-Vif
11264	11291	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-(vH-vL)-CD3g-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-Vif
11265	11292	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-(vH-vL)-CD3z-ECDTMCP-opt2-P2A-hNEMO-K277A-Flag-T2A-Vif
11266	11293	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-Vif
11267	11294	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz-2A-Vif
11268		pLenti-EF1a-CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz-2A-Vif
11269		pCDNA3-Vif

Tabla 10. Anticuerpos biespecíficos ejemplares que se dirigen a diferentes antígenos

		Ag x CD3		Ag x CD28		Ag x 41BB	
Antígeno (Ag)	Dominio de unión a antígeno	SEQ ID NO (ADN)	SEQ ID NO (PRT)	SEQ ID NO (ADN)	SEQ ID NO (PRT)	SEQ ID NO (ADN)	SEQ ID NO (PRT)
CD19	FMC63	11620	11790	11676	11846	11732	11902
CD19	huFMC63-11	11621	11791	11677	11847	11733	11903
CD19	huFMC63-11-N203Q	11622	11792	11678	11848	11734	11904
CD19	CD19Bu12	11623	11793	11679	11849	11735	11905
CD19	CD19MM	11624	11794	11680	11850	11736	11906
CD19	Ritx-CD19-MOR0028	11625	11795	11681	11851	11737	11907
CD19	CD19-hu-mROO5-1	11626	11796	11682	11852	11738	11908
BCMA	BCMA-J6M0	11627	11797	11683	11853	11739	11909
BCMA	BCMA-huC12A3-L3H3	11628	11798	11684	11854	11740	11910
BCMA	BCMA-huC11.D5.3L1 H3	11629	11799	11685	11855	11741	11911
BCMA	BCMA-huC13-F12	11630	11800	11686	11856	11742	11912
CD20	CD20-2F2	11631	11801	11687	11857	11743	11913
CD20	CD20-GA101	11632	11802	11688	11858	11744	11914
CD20	CD20-2H7	11633	11803	11689	11859	11745	11915
CD20	CD20-Ubli-v4	11634	11804	11690	11860	11746	11916
CD20	CD20-2H7	11635	11805	11691	11861	11747	11917
CD20	CD20-7D8	11636	11806	11692	11862	11748	11918
CD22	CD22-h10F4v2	11637	11807	11693	11863	11749	11919
CD22	CD22-H22Rhov2A	11638	11808	11694	11864	11750	11920
CD22	CD22-m971-HL	11639	11809	11695	11865	11751	11921
CD22	CD22-5-HL	11640	11810	11696	11866	11752	11922
CD22	CD22-10-HL	11641	11811	11697	11867	11753	11923
CD22	CD22-HA22	11642	11812	11698	11868	11754	11924
CD30	CD30-5F11	11643	11813	11699	11869	11755	11925
CD30	CD30-Ac10	11644	11814	11700	11870	11756	11926
CD32	CD32-Med9	11645	11815	11701	11871	11757	11927
CD33	CD33-AF5	11646	11816	11702	11872	11758	11928
CD33	CD33-huMyc9	11647	11817	11703	11873	11759	11929
CD33	CD33-Him3-4	11648	11818	11704	11874	11760	11930
CD33	CD33-SGNh2H12	11649	11819	11705	11875	11761	11931

		Ag x CD3			Ag x CD28		Ag x 41BB	
CD33	CD33-15G15-33	11650	11820		11706	11876	11762	11932
CD33	CD33-33H4	11651	11821		11707	11877	11763	11933
CD123	CD123-CSL362	11652	11822		11708	11878	11764	11934
CD123	CD123-1172	11653	11823		11709	11879	11765	11935
CD123	CD123-DART-1	11654	11824		11710	11880	11766	11936
CD123	CD123-DART-2	11655	11825		11711	11881	11767	11937
CD123	CD123-9D7	11656	11826		11712	11882	11768	11938
CD123	CD123-3B10	11657	11827		11713	11883	11769	11939
CD138	CD138	11658	11828		11714	11884	11770	11940
CS1	CS1-HuLuc64	11659	11829		11715	11885	11771	11941
CS1	CS1-huLuc90	11660	11830		11716	11886	11772	11942
FLT3	FLT3-NC7	11661	11831		11717	11887	11773	11943
MPL	MPL-175	11662	11832		11718	11888	11774	11944
MPL	MPL-161	11663	11833		11719	11889	11775	11945
MPL	MPL-111	11664	11834		11720	11890	11776	11946
MPL	Hu-161-2	11665	11835		11721	11891	11777	11947
MPL	MPL-hu-175-2	11666	11836		11722	11892	11778	11948
MPL	MPL-hu-111-2	11667	11837		11723	11893	11779	11949
Lym1	Lym1	11668	11838		11724	11894	11780	11950
Lym2	Lym2	11669	11839		11725	11895	11781	11951
CD70	CD70-h1F6	11670	11840		11726	11896	11782	11952
CD79b	CD79b-2F2	11671	11841		11727	11897	11783	11953
CD179b	CD179b	11672	11842		11728	11898	11784	11954
GPRC5D	GPRC5D-ET150-5	11673	11843		11729	11899	11785	11955
GPRC5D	GPRC5D-ET150-18	11674	11844		11730	11900	11786	11956

Tabla 11:

CAR OBJETIVO	"X"	EJEMPLOS DE ENFERMEDAD OBJETIVO DE LOS AUTOMÓVILES (es decir, los CAR convencionales y los CAR de próxima generación. Por ejemplo, SIR, Ab-TCR, TFP y zSIR)
CD19		ALL, CLL, linfoma, crisis de blastos linfoides de CML, mieloma múltiple, trastornos inmunitarios
ALK		Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), ALCL (linfoma anaplásico de células grandes), IMT (tumor miofibroblástico inflamatorio), o neuroblastoma
CD45		Tipos de cáncer hematológicos
BCMA		Mieloma, PEL, leucemia de células de plasma, macroglobulinemia de Waldenstrom
CD5		Cáncer hematológico, leucemia de linfocitos T, linfoma de linfocitos T
BAFF-R		Cáncer de sangre, leucemia linfocítica crónica, B-ALL
CD20		Tipos de cáncer hematológicos, leucemia, ALL, CLL, linfoma, trastornos inmunitarios

CAR OBJETIVO	"X"	EJEMPLOS DE ENFERMEDAD OBJETIVO DE LOS AUTOMÓVILES (es decir, los CAR convencionales y los CAR de próxima generación. Por ejemplo, SIR, Ab-TCR, TFP y zSIR)
CD22		Tipos de cáncer hematológicos, leucemia, ALL, CLL, linfoma, crosos de blastos linfoides de CML, trastornos inmunitarios
CD23		Tipos de cáncer hematológicos, leucemia, ALL, CLL, linfoma, trastornos autoinmunitarios
CD30		Linfoma de Hodgkins, linfoma de linfocitos T cutáneo
CD32		Tumores sólidos
CD33		Tipos de cáncer hematológicos, AML, MDS
CD34		Tipos de cáncer hematológicos, AML, MDS
CD44v6		Tipos de cáncer hematológicos, AML, MDS
CD70		Tipos de cáncer hematológicos, linfoma, mieloma, macroglobulinemia de Waldenstrom
CD79b		Tipos de cáncer hematológicos, ALL, linfoma
CD123		Tipos de cáncer hematológicos, AML, MDS
CD138		Tipos de cáncer hematológicos, mieloma, PEL, leucemia de células de plasma, macroglobulinemia de Waldenstrom
CD179b		Tipos de cáncer hematológicos, ALL, linfoma
CD276/B7-H3		Sarcoma de Ewing, neuroblastoma, rabdomiosarcoma, tipos de cáncer de ovario, colorectal y de pulmón
CD324		Tumores sólidos, tipos de cáncer de esófago, próstata, colorectal, de mama y de pulmón
CDH6		Tumores sólidos, tipos de cáncer de riñón, ovario, tiroides
CDH17		Adenocarcinomas, tipos de cáncer gastrointestinal, de pulmón, de ovario, de endometrio
CDH19		Tumor sólido, melanoma
EGFR		Cáncer de colon, cáncer de pulmón
CLEC5A		Tipos de cáncer hematológicos, leucemia, AML
GR/LHR		Cáncer de próstata, cáncer de ovarios o cáncer de mama
CLL1		Cáncer hematológico, leucemia
CMVpp65		Infección por CMV, colitis por CMV, neumonitis por CMV
CS1		Tipos de cáncer hematológicos, mieloma, PEL, leucemia de células de plasma
CSF2RA		AML, CML, MDS
CD123		Tipos de cáncer hematológicos, AML, MDS
DLL3		Melanoma, cáncer de pulmón o cáncer de ovarios
EBNA3c/MHC I		Infección por virus Epstein Barr y enfermedades relacionadas que incluyen tipos de cáncer
EBV-gp350		Infección por virus Epstein Barr y enfermedades relacionadas
EGFR		Tumores sólidos, cáncer de colon, cáncer de pulmón
EGFRvIII		Tumores sólidos, glioblastoma
EpCam1		Cáncer gastrointestinal
FLT3		Tipos de cáncer hematológicos, AML, MDS, ALL
Receptor de folato alfa (FR1 o FOLR1)		Cáncer de ovarios, NSCLC, cáncer de endometrio, cáncer de riñón u otros tumores sólidos
FSHR		Cáncer de próstata, cáncer de ovarios o cáncer de mama
GD2		Neuroblastoma
GD3		Melanoma
GFRa4		Cáncer, cáncer medular de tiroides

CAR OBJETIVO	"X"	EJEMPLOS DE ENFERMEDAD OBJETIVO DE LOS AUTOMÓVILES (es decir, los CAR convencionales y los CAR de próxima generación. Por ejemplo, SIR, Ab-TCR, TFP y zSIR)
Fucosil-GM1(GM1)		Cáncer de pulmón de células pequeñas
GPRC5D		Mieloma, PEL, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldenstrom
gp100		Melanoma
GPC3		Tumores sólidos, cáncer de pulmón
gpNMB		Melanoma, tumores de cerebro, tipos de cáncer de cerebro
GRP78		Mieloma
Her2		Tumores sólidos, cáncer de mama, cáncer de estómago
Her3		Cáncer colorectal, cáncer de mama
HMW-MAA		Melanoma
HTLV1-TAX/MHC I		Enfermedades asociadas a infección por HTLV1, leucemia-linfoma de linfocitos T de adulto
IL11Ra		Tipos de cáncer hematológicos, AML, ALL, CML, MDS, sarcomas
IL6Ra		Tumores sólidos, cáncer de hígado
IL13Ra2		Glioblastomas
KSHV-K8.1		Sarcoma de Kaposi, PEL, enfermedad de Castleman multicéntrica
LAMP1		Tipos de cáncer hematológicos, AML, ALL, MDS, CLL, CML
LewisY		Tipos de cáncer
L1CAM		Tumores sólidos, tipos de cáncer de ovario, mama, endometrio, melanoma
LHR		Cáncer de próstata, cáncer de ovarios o cáncer de mama
Lym1		Cáncer hematológico, leucemia, linfoma
Lym2		Cáncer hematológico, leucemia, linfoma
CD79b		Tipos de cáncer hematológicos, linfoma
MART1/MHC I		Melanoma
Mesotelina		Mesotelioma, cáncer de ovarios, cáncer de pancreas
Muc1/MHC I		Cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y otros tumores sólidos
Muc16		Cáncer de ovarios
NKG2D		Leucemia, linfoma o myeloma
NYBR1		Cáncer de mama
PSCA		Cáncer de próstata
PR1/MHC I		Cáncer hematológico, leucemia
Receptor de prolactina		Cáncer de mama, cáncer de células renales cromóforo
PSMA		Cáncer de próstata
PTK7		Melanoma, cáncer de pulmón o cáncer de ovarios
ROR1		Cáncer hematológico, neoplasia de linfocitos B, linfoma, CLL
SLea		Cáncer pancreático, cáncer de colon
SSEA4		Cáncer de páncreas
Tirosinasa/MHC I		Melanoma
TCRB1		Leucemias y linfomas de linfocitos T, trastornos autoinmunitarios
TCRB2		Leucemias y linfomas de linfocitos T, trastornos autoinmunitarios
TCRgd		Leucemias y linfomas de linfocitos T, trastornos autoinmunitarios
hTERT		Tumores sólidos, tipos de cáncer hematológicos

CAR	"X"	EJEMPLOS DE ENFERMEDAD OBJETIVO DE LOS AUTOMÓVILES (es decir, los CAR convencionales y los CAR de próxima generación. Por ejemplo, SIR, Ab-TCR, TFP y zSIR)
TGFB2		Tumores sólidos, queloide
TIM1/HAVER1		Cáncer de riñón, cáncer de hígado
TROP2		Tumores sólidos, cáncer de mama, cáncer de próstata
TSHR		Cáncer de tiroides, leucemia de linfocitos T, linfoma de linfocitos T
TSLPR		Tipos de cáncer hematológicos, leucemias, AML, MDS
Tirosinasa/MHC I		Melanoma
VEGFR3		Tumores sólidos
WT1/MHC I		Tipos de cáncer hematológicos, AML
Receptor de folato β		AML, mieloma
B7H4		Cáncer de mama o cáncer de ovarios
CD23		Tipos de cáncer hematológicos, leucemias, CLL
GCC		Cáncer gastrointestinal
CD200R		Tipos de cáncer hematológicos, AML, MDS
AFP/MHC I		Tumores sólidos, cáncer de hígado
CD99		Cáncer de hígado
GPRC5D		Mieloma, macroglobinemia de Waldenstrom
HPV16-E7/MHC I		Tipos de cáncer asociados a HPV16, cáncer de cuello uterino, tipos de cáncer de cabeza y cuello
Factor de tejido 1 (TF1)		Tumores sólidos
Tn-Muc1		Tumores sólidos y tipos de cáncer hematológicos
Cadena liviana de Igk		Mieloma, leucemia de células plasmáticas
Ras G12V/ MHC I		Tumores sólidos y tipos de cáncer hematológicos
CLD18A2 (Claudina 18.2)		Cáncer gástrico, pancreático, de esófago, de ovarios o pulmón
CD43		Tipos de cáncer hematológicos, AML
NY-ESO-1/MHC I		Mieloma
MPL/TPO-R		Cáncer hematológico, AML, MDS, CML, ALL
Glicoproteína P (MDR1)		Cáncer de riñón, cáncer de hígado, mieloma
CD179a		Tipos de cáncer hematológicos, leucemia aguda, CLL, ALL, linfoma
STEAP1		Cáncer gástrico o de próstata o linfoma
Liv1 (SLC39A6)		Cáncer de mama o próstata
Nectina 4 (PVRL4)		Cáncer de vejiga, de riñón, de cuello uterino, de pulmón, de cabeza y cuello o de mama
Cripto (TDGF1)		Cáncer de colorrectal o de endometrio o de ovarios
gpA33		Cáncer de colorrectal o de endometrio o de ovarios
FLT3		Tipos de cáncer hematológicos, AML, ALL, MDS
BST1/CD157		Tipos de cáncer hematológicos, AML, MDS
IL1RAP		Cáncer de hígado, colorrectal, de cuello uterino, pulmón o de ovarios
Canal de cloruro		Glioma
IgE		Alergia
HLA-A2		Enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de tejido (SIR expresado en linfocitos T reguladores)

CAR OBJETIVO	"X"	EJEMPLOS DE ENFERMEDAD OBJETIVO DE LOS AUTOMÓVILES (es decir, los CAR convencionales y los CAR de próxima generación. Por ejemplo, SIR, Ab-TCR, TFP y zSIR)
Amiloide		Amiloideosis, enfermedad de Alzheimer
Envoltura de VIH1		VIH1/SIDA y afecciones relacionadas
VIH1-gag		VIH1/SIDA y afecciones relacionadas
Gripe A HA		Infección por gripe A
Integrina B7		Neoplasias de células plasmáticas, linfoma de derrame primario
Muc17		Cáncer de páncreas, cáncer de colon
CD16ORF54		Tipos de cáncer hematológicos
VISTA		Tipos de cáncer hematológicos
Muc5Ac		Cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de colon
FCRH5		Neoplasia de células plasmáticas
LYPD1		Cáncer de ovario, cáncer de endometrio, melanoma
EMR2		Leucemia aguda, linfoma, cáncer de mama, cáncer de colon
gpNMB		Melanoma, cáncer de cerebro, cáncer de mama, tumores sólidos
RNF43		Cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de endometrio
CD44v6		Cánceres epiteliales
Robo4		Cáncer de riñón, colon, cáncer de mama, tumores sólidos
GPC3		Cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de mama
FOLR1		Cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, tumores sólidos
CLDN6		Cáncer de ovario, cáncer de hígado
MMP16		Melanoma, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón pequeño, neuroblastoma
BMPR1B		Cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario
Ly6E		Mama, ovario, páncreas, pulmón
WISP1		Glioblastoma, cáncer de mama
SLC34A2		Cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de endometrio
CD133		Cáncer de pulmón, cáncer de cerebro

Tabla 12:

Antígeno (Ag)	Dominio de unión antígeno	Ag x CD3		Ag x CD28		Ag x 41BB	
		SEQ ID NO (ADN)	SEQ ID NO (PRT)	SEQ ID NO (ADN)	SEQ ID NO (PRT)	SEQ ID NO (ADN)	SEQ ID NO (PRT)
CD19	FMC63	11620	11790	11676	11846	11732	11902
CD19	huFMC63-11	11621	11791	11677	11847	11733	11903
CD19	huFMC63-11-N203Q	11622	11792	11678	11848	11734	11904
CD19	CD19Bu12	11623	11793	11679	11849	11735	11905
CD19	CD19MM	11624	11794	11680	11850	11736	11906
CD19	Ritx-CD19-MOR0028	11625	11795	11681	11851	11737	11907
CD19	CD19-hu-mROO5-1	11626	11796	11682	11852	11738	11908
BCMA	BCMA-J6M0	11627	11797	11683	11853	11739	11909

BCMA	BCMA-huC12A3-L3H3	11628	11798		11684	11854		11740	11910
BCMA	BCMA-huC11.D5.3L1 H3	11629	11799		11685	11855		11741	11911
BCMA	BCMA-huC13-F12	11630	11800		11686	11856		11742	11912
CD20	CD20-2F2	11631	11801		11687	11857		11743	11913
CD20	CD20-GA101	11632	11802		11688	11858		11744	11914
CD20	CD20-2H7	11633	11803		11689	11859		11745	11915
CD20	CD20-Ubli-v4	11634	11804		11690	11860		11746	11916
CD20	CD20-2H7	11635	11805		11691	11861		11747	11917
CD20	CD20-7D8	11636	11806		11692	11862		11748	11918
CD22	CD22-h10F4v2	11637	11807		11693	11863		11749	11919
CD22	CD22-H22Rhov2A	11638	11808		11694	11864		11750	11920
CD22	CD22-m971-HL	11639	11809		11695	11865		11751	11921
CD22	CD22-5-HL	11640	11810		11696	11866		11752	11922
CD22	CD22-10-HL	11641	11811		11697	11867		11753	11923
CD22	CD22-HA22	11642	11812		11698	11868		11754	11924
CD30	CD30-5F11	11643	11813		11699	11869		11755	11925
CD30	CD30-Ac10	11644	11814		11700	11870		11756	11926
CD32	CD32-Med9	11645	11815		11701	11871		11757	11927
CD33	CD33-AF5	11646	11816		11702	11872		11758	11928
CD33	CD33-huMyc9	11647	11817		11703	11873		11759	11929
CD33	CD33-Him3-4	11648	11818		11704	11874		11760	11930
CD33	CD33-SGNh2H12	11649	11819		11705	11875		11761	11931
CD33	CD33-15G15-33	11650	11820		11706	11876		11762	11932
CD33	CD33-33H4	11651	11821		11707	11877		11763	11933
CD123	CD123-CSL362	11652	11822		11708	11878		11764	11934
CD123	CD123-1172	11653	11823		11709	11879		11765	11935
CD123	CD123-DART-1	11654	11824		11710	11880		11766	11936
CD123	CD123-DART-2	11655	11825		11711	11881		11767	11937
CD123	CD123-9D7	11656	11826		11712	11882		11768	11938
CD123	CD123-3B10	11657	11827		11713	11883		11769	11939
CD138	CD138	11658	11828		11714	11884		11770	11940
CS1	CS1-HuLuc64	11659	11829		11715	11885		11771	11941
CS1	CS1-huLuc90	11660	11830		11716	11886		11772	11942
FLT3	FLT3-NC7	11661	11831		11717	11887		11773	11943
MPL	MPL-175	11662	11832		11718	11888		11774	11944

MPL	MPL-161	11663	11833		11719	11889		11775	11945
MPL	MPL-111	11664	11834		11720	11890		11776	11946
MPL	Hu-161-2	11665	11835		11721	11891		11777	11947
MPL	MPL-hu-175-2	11666	11836		11722	11892		11778	11948
MPL	MPL-hu-111-2	11667	11837		11723	11893		11779	11949
Lym1	Lym1	11668	11838		11724	11894		11780	11950
Lym2	Lym2	11669	11839		11725	11895		11781	11951
CD70	CD70-h1F6	11670	11840		11726	11896		11782	11952
CD79b	CD79b-2F2	11671	11841		11727	11897		11783	11953
CD179b	CD179b	11672	11842		11728	11898		11784	11954
GPRC5D	GPRC5D-ET150-5	11673	11843		11729	11899		11785	11955
GPRC5D	GPRC5D-ET150-18	11674	11844		11730	11900		11786	11956

Tabla 13: Cadenas de TCR útiles en varias realizaciones:

SEQ ID NO (PRT)	Cadenas de TCR
4038	región-constante-de-hTCR-alfa_X02883.1
4039	hTCRa-WT
4040	hTCRa-CSDVP
4041	hTCRa-opt2
4042	hTCRa-T48C-opt
4043	hTCRa-T48C-opt1
4044	hTCRa-SDVP
4045	hTCRa-S61R
4046	hTCRa-SDVPR
4047	hTCRaECD-CD3zECDTMCP-opt2
4048	región-constante-de-hTCR-b1_X00437.1
4049	constante hTCR-b2
4050	hTCRb-WT
4051	hTCRb-S57C-opt1
4052	hTCRb-KACIAH
4053	hTCRb-opt2
4054	hTCRb-KAIAH
4055	hTCRb-R79G
4056	hTCRbECD-CD3zECDTMCP-opt
4057	preTCRa_gb_U38996.1
4058	preTCRa
4059	preTCRa-del48
4060	hTCR-gama_M27331.1
4061	hTCR-Gama-Opt
4062	hTCR-Delta
4063	hTCR-Delta-Opt
12602	TCRa dominio transmembrana
12603	TCRb dominio transmembrana
12604	TCRd dominio transmembrana

12605	TCRg dominio transmembrana
12606	TCRa péptido de conexión
12607	TCRb péptido de conexión
12608	TCRd péptido de conexión
12609	TCRy péptido de conexión
12610	TCRa péptido de conexión MD
12611	TCRb péptido de conexión MD
12612	TCRd péptido de conexión MD
12613	TCRy péptido de conexión MD
12614	TCRb dominio intracelular
12615	TCRy dominio intracelular
12616	TCRD alfa
12617	TCRD beta
12618	TCRD alfa MD
12619	TCRD beta MD
12620	TCRD delta
12621	TCRD gama
12622	TCRD delta MD
12623	TCRD gama MD
12624	CD3e-ECDTMCP
12625	CD3e-ECD
12626	CD3e-TM
12627	CD3e-CP
12628	CD3d-ECDTMCP
12629	CD3d-ECD
12630	CD3d-TM
12631	CD3d-CP
12632	CD3g-ECDTMCP
12633	CD3g-ECD
12634	CD3g-TM
12635	CD3g-CP
12636	CD3zECDTMCP
12637	CD3z-TM
12638	CD3z-CP

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden ácidos nucleicos que codifican los CAR 1-15 (Tabla 1), en los que el dominio específico del antígeno del CAR se dirige a uno o más antígenos específicos como se describe en las **Tablas 3** o en las Tablas 5-6 de PCT / US2017 / 064379, que se incorporan aquí como referencia. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden ácidos nucleicos que codifican una o más de las cadenas principales 1-60 (Tabla 2) donde el dominio específico de antígeno del CAR codificado se dirige a uno o más antígenos específicos como se describe en este documento y en la **Tabla 3** o en las Tablas 5- 6 del PCT / US2017 / 064379. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden ácidos nucleicos que codifican el esqueleto-1, donde el dominio específico de antígeno del CAR en el esqueleto-1 se dirige a uno o más antígenos específicos del cáncer como se describe en el presente documento y en la **Tabla 3** o en las Tablas 5-6

de PCT / US2017/ 064379. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden ácidos nucleicos que codifican el esqueleto-8, en los que el dominio específico de antígeno del CAR en el esqueleto-1 se dirige a uno o más antígenos específicos del cáncer como se describe en el presente documento y en la **Tabla 3** o en las Tablas 5-6 de PCT / US2017/064379.

5 En varias realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los componentes CAR de las cadenas principales descritas en el presente documento codifican uno, dos, tres o más dominios específicos de antígeno (ASD).

10 En diversas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los componentes CAR de las cadenas principales descritas en el presente documento codifican cero, uno, dos, tres o más dominios coestimuladores.

En diversas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los componentes CAR de las cadenas principales descritas en el presente documento codifican cero, uno, dos, tres o más dominios de señalización intracelular.

15 En diversas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el CAR y las cadenas principales descritas en el presente documento codifican cero, uno, dos, tres o más módulos accesorios.

20 Las secuencias de ácido nucleico que codifican los componentes deseados de los CAR y los módulos accesorios descritos en este documento se pueden obtener usando métodos recombinantes conocidos en la técnica. Alternativamente, el ácido nucleico de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente descritas en este documento que expresan los CAR y los componentes accesorios descritos en el presente documento también expresan agentes que reducen la toxicidad de los CAR.

25 En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente descritas en el presente documento que expresan los CAR y los componentes accesorios descritos en el presente documento también expresan agentes que mejoran la actividad de los CAR.

En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente descritas en el presente documento que expresan los CAR y los componentes accesorios descritos en el presente documento también expresan agentes que mejoran la persistencia de los CAR.

30 En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente descritas en el presente documento que expresan los CAR y los componentes accesorios descritos en el presente documento también expresan agentes que evitan el agotamiento de los CAR.

35 Las composiciones que comprenden varias cadenas principales como se describen en el presente documento comprenden CAR que comprenden uno o más ASD que se unen específicamente a un antígeno asociado al cáncer como se describe en el presente documento. Las secuencias del ASD son contiguas y están en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica el resto de una o más cadenas de CAR.

40 Los polinucleótidos, polipéptidos, construcciones de expresión, células modificadas por ingeniería recombinante que expresan CAR que comprenden los dominios de unión a antígenos de la divulgación, así como el método para fabricar y usar dichos polipéptidos, polinucleótidos y células se describen en métodos conocidos en la técnica y métodos descritos en PCT / US2017 / 024843, WO

2014/160030 A2, WO 2016/187349 A1, PCT / US2016 / 058305, WO 2015/117229 A1 y PCT / US17 / 64379, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

La divulgación proporciona varios dominios de unión a antígeno que pueden usarse en la generación de CAR (por ejemplo, CAR 1-15 y cadenas principales 1-60) para aplicaciones en terapia celular adoptiva. En algunas realizaciones, estos dominios de unión a antígenos se derivan de anticuerpos y antígenos diana que se expresan en cáncer, trastornos proliferativos no cancerosos (por ejemplo, endometriosis) y / o trastornos inmunes. Los antígenos diana, SEQ ID (ADN) y SEQ ID (PRT) de los fragmentos vL, vH y scFv de estos dominios de unión al antígeno se muestran en la **Tabla 3**. Las CDR de los fragmentos vL y vH de los dominios de unión al antígeno que se dirigen a diferentes antígenos son se muestra en la **Tabla 4**.

En algunas realizaciones, el (los) dominio (s) de unión al antígeno codificado del polipéptido CAR que se dirige a un antígeno específico comprenden una o más secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (vL o VL) de las SEQ ID NO 4118 a 4190, 9631 a 9660 y 11460 a 11462, 14386 a 14415 dirigiendo ese antígeno como se enumera en la **Tabla 3** en el que hasta 9 residuos de aminoácidos pero no más de 10 aminoácidos se reemplazan por cualquier otro residuo de aminoácido, o secuencias con 80-100% de identidad con secuencias de aminoácidos como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO 4118 a 4190, 9631 a 9660, o 11460 a 11462 y 14386 a 14415, o secuencias con 85-100% de identidad con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cualquiera de SEQ ID NO SEQ ID NO 4118 a 4190, 9631 a 9660, o 11460 a 11462 y 14386 a 14415. Las CDR1, CDR2 y CDR3 de los fragmentos vL con la SEQ ID NO: 4118 a 4190, 9631 a 9660 o 11460 a 11462 están representados por SEQ ID NO: 11961 a 12066, 12068 a 12173, 12175 a 12280, respectivamente (**Tabla 4**).

En algunas realizaciones, el polipéptido codificado de uno o más dominios de unión a antígeno de los CAR (CAR convencionales y CAR de próxima generación, por ejemplo, SIR, zSIR, Ab-TCR, Tri-Tac y TFP) comprende uno o más dominios variables de cadena pesada. (vH o VH) secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 4192 a 4264, 9662 a 9691, 11464 a 11466 y 14417 a 14446 dirigidas a ese antígeno como se enumera en la Tabla 3 en las que se encuentran hasta 9 residuos de aminoácidos pero no más de 10 reemplazado por cualquier otro residuo o secuencia de aminoácidos con 80-100% de identidad con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 4192 a 4264, 9662 a 9691, 11464 a 11466 y 14417 a 14446 o secuencias con 85-100% de identidad con la complementariedad regiones determinantes (CDR) de cualquiera de las SEQ ID NO 4192 a 4264, 9662 a 9691, 11464 a 11466 y 14417 a 14446. Las CDR1, CDR2 y CDR3 de los fragmentos vH con la SEQ ID NO: 4192 a 4264, 9662 a 9691, 11464 a 11466 y 14417 a 14446 están representados por las SEQ ID NO: 12282 a 12387, 12389 a 12494, 1 2497 a 12602, 16219-16310 respectivamente (Tabla 4).

En algunas realizaciones, uno o más dominios de unión a antígeno codificados del polipéptido CAR 1-15 y cadenas principales 1-60 comprenden una o más secuencias de aminoácidos de fragmentos variables de cadena única (scFv) de SEQ ID NO 4266 a 4338. , 9693 a 9722, 11468 a 11470 y 14448-14477 en los que hasta 9 residuos de aminoácidos pero no más de 10 aminoácidos se reemplazan por cualquier otro residuo o secuencia de aminoácidos con 80-100% de identidad con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 4266 a 4338, 9693 a 9722, 11468 a 11470 y 14448-14477 o secuencias con 85-100% de identidad con las regiones determinantes de complementariedad (CDR)

de SEQ ID NO 4266 a 4338, 9693 a 9722, 11468 a 11470 y 14448 -14477. Las CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones vL de los fragmentos scFv con las SEQ ID NO: 4266 a 4338, 9693 a 9722, 11468 a 11470 y 14448-14477 están representadas por las SEQ ID NOs: 11961 a 12066, 12068 a 12173, 12175 a 12280, 16126-16217 respectivamente (**Tabla 4**). Las CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones vH de los fragmentos scFv con la SEC ID NO: 4266 a 4338, 9693 a 9722, 11468 a 11470 y 14448-14477 están representadas por las SEC ID NO: 12282 a 12387, 12389 a 12494 y 12497 a 12602 y 16219-16310 respectivamente (**Tabla 4**).

Debe entenderse que el orden de los fragmentos vL y vH en un fragmento scFv puede ser vL-vH o vH-vL. Por lo tanto, aunque los fragmentos scFv ejemplares mostrados en la Tabla 3 representan la orientación vL-vH o vH-vL, los fragmentos scFv con la orientación complementaria (es decir, vH-vL y vL-vH) también pueden usarse en los métodos o composiciones de la divulgación.

Las SEQ ID de ADN y PRT de elementos ejemplares que se pueden usar en la construcción de diferentes CAR 1-15 y cadenas principales 1-60 se enumeran en la **Tabla 5**. Las SEQ ID de ácidos nucleicos y aminoácidos de los CAR convencionales ejemplares (por ejemplo, CAR de segunda generación que contienen dominios coestimuladores 41BB) y CAR de próxima generación (por ejemplo, SIR, zSIR, Ab-TCR y TFP) basados en los fragmentos vL y vH derivados de un scFv BCMA-AM06-HL se proporcionan en la **Tabla 6**. Las SEQ ID de ácidos nucleicos y aminoácidos de los CAR convencionales ejemplares (por ejemplo, CAR de segunda generación que contienen dominios coestimuladores 41BB) y CAR de próxima generación (por ejemplo, SIR, zSIR, Ab-TCR y TFP) basados en los fragmentos vL y vH derivados de otros fragmentos scFv puede derivarse reemplazando los fragmentos vL y vH de scFv BCMA-AM06-HL con los fragmentos vL y vH de los fragmentos scFv enumerados en la **Tabla 3**. La secuencia de construcciones de CAR ejemplares que contienen diferentes dominios de unión a antígeno se hace referencia en la **Tabla 7**. El orden de las diferentes construcciones de CAR en la **Tabla 7** es como se muestra en la Tabla 6 para los CAR basados en BCMA-Am06-HL. Por tanto, el constructo CAR representado por SEQ ID NO: 475 se parece al constructo CAR representado por SEQ ID NO: 377 con la excepción de que los fragmentos vL y vH correspondientes al dominio de unión al antígeno BCMA-Am06-HL se reemplazan con vL y vH fragmentos correspondientes al dominio de unión al antígeno BCMA-Am14-HL. De manera similar, el constructo CAR representado por SEQ ID NO: 476 se parece al constructo CAR representado por SEQ ID NO: 378 con la excepción de que los fragmentos vL y vH correspondientes al dominio de unión al antígeno BCMA-Am06-HL se reemplazan con vL y vH fragmentos correspondientes al dominio de unión al antígeno BCMA-Am14-HL.

En varias realizaciones, los dominios de unión a antígenos de la divulgación muestran propiedades superiores in vitro e in vivo, tales como afinidad de unión a los antígenos diana, secreción de citocinas, proliferación, citotoxicidad, agotamiento y persistencia a largo plazo, cuando se usan en la construcción de CAR (es decir, CAR convencionales y CAR de próxima generación). En varias realizaciones, estos dominios de unión a antígenos muestran diversas propiedades in vitro e in vivo, tales como afinidad de unión a los antígenos diana, secreción de citocinas, proliferación, citotoxicidad, agotamiento y persistencia a largo plazo, cuando se utilizan en la construcción de CAR (es decir, convencionales CAR y CAR de próxima generación). En varias realizaciones, los CAR que contienen estos antígenos diana pueden usarse para generar una respuesta inmune diversa.

La divulgación contempla además los CAR que se dirigen al mismo antígeno pero con diferentes dominios de unión al antígeno y pueden poseer diversas propiedades biológicas dependiendo en parte del epítipo del antígeno dirigido por ellos. Por tanto, los dos grupos de CAR que se dirigen a Her2 representados por SEQ ID NO : 2435 -2483 y SEQ ID NO : 2386 -2434, véanse las

5 filas 12 -13 de la **Tabla 7**, muestran diferentes propiedades biológicas, como la activación de células T, la secreción de citoquinas y citotoxicidad.

En algunas realizaciones, el dominio específico de antígeno de la molécula CAR codificada comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un scFv, un Fv, un Fab, un (Fab ') ², un anticuerpo de dominio único (SDAB), un VH o dominio VL, o un dominio VHH de camélidos. En algunas

10 realizaciones, el dominio de unión a antígeno del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv que se humaniza en comparación con la secuencia murina del scFv del que se deriva.

En algunos casos, los scFv pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 y Huston et al., (1988) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Las moléculas ScFv pueden producirse al ligar las regiones VH y VL juntas

15 mediante ligadores de polipéptidos flexibles. Las moléculas scFv comprenden un ligador (por ejemplo, un ligador Ser-Gly) con una longitud optimizada y/o una composición de aminoácidos (por ejemplo, para optimizar el plegado, etc.). La longitud del enlazador puede afectar en gran medida cómo las regiones variables de un scFv se pliegan e interactúan. Por ejemplo, si se emplea un engarce polipeptídico corto (por ejemplo, entre 5-10 aminoácidos) se evita el plegamiento intracadena. El plegamiento entre

20 cadenas puede ser útil para unir las dos regiones variables para formar un sitio de unión de epítipo funcional. Para ejemplos de orientación y tamaño del enlazador, ver, por ejemplo, Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-6448, Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. NOS. 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, y Publicaciones PCT NOS. WO2006 / 020258 y WO2007 / 024715, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

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. En algunas realizaciones, la secuencia enlazadora comprende los aminoácidos glicina y serina. En otra realización, la secuencia enlazadora comprende conjuntos de repeticiones de glicina y serina tales

30 como (Gly4Ser) _n, donde n es un número entero positivo igual o mayor que 1. En una realización, el enlazador puede ser (Gly4Ser) ₃ o (Gly4Ser) ₃ o enlazador Whitlow. La variación en la longitud del conector puede retener o potenciar la actividad, dando lugar a una eficacia superior en los estudios de actividad.

En una realización, el dominio específico de antígeno de un CAR que se dirige a un

35 antígeno específico comprende una, dos o las tres CDR de vH (cadena pesada) (es decir, vH-CDR1, vH-CDR2 y vH-CDR3) de un dominio de unión a antígeno enumerado en este documento (Tabla 4) (Tabla 4), y / o una, dos o las tres CDR vL (cadena ligera) (es decir, vL-CDR1, vL-CDR2 y vL-CDR3) de un dominio de unión a antígeno enumerado en este documento (Tabla 4).

En otra realización, el dominio específico de antígeno comprende un anticuerpo

40 humanizado o un fragmento de anticuerpo.

En algunas realizaciones, el dominio específico de antígeno de un CAR descrito en el presente documento es un fragmento de anticuerpo scFv. En otras realizaciones, el fragmento de anticuerpo tiene una menor afinidad de unión al antígeno en comparación con el anticuerpo del que se deriva, pero es funcional porque proporciona una respuesta biológica descrita en el presente documento. En una forma de realización, la molécula CAR comprende un fragmento de anticuerpo que

5 tiene una afinidad de fijación KD de 10^{-4} M a 10^{-8} M, 10^{-5} M a 10^{-7} M, 10^{-6} M o 10^{-8} M, para el antígeno diana.

En algunas realizaciones, el dominio específico de antígeno de un CAR descrito en el presente documento se une a un péptido presentado por MHC. Se han descrito anticuerpos de tipo

10 TCR que se dirigen a péptidos derivados de antígenos virales o tumorales en el contexto del antígeno leucocitario humano (HLA) -A1 o HLA-A2. Por ejemplo, se puede identificar un anticuerpo similar a TCR a partir del cribado de una biblioteca, como una biblioteca presentada en fagos scFv humano.

En algunas realizaciones, cuando los CAR que comprenden fragmentos funcionales de anticuerpos (incluidos los fragmentos scFv), como se describe en el presente documento, se unen al

15 antígeno diana, se induce una respuesta biológica como la activación de una respuesta inmune, la producción de citocinas, la citotoxicidad y la como, como entenderá un experto en la materia.

En algunas realizaciones, los antígenos específicos de la enfermedad que pueden ser dirigidos por CAR convencionales (por ejemplo, CAR de segunda generación), CAR de próxima generación (por ejemplo, zSIR, SIR, Ab-TCR, Tri-TAC, TFP, etc.) y rTCR cuando se expresa solo o con

20 los módulos accesorios, como se describe en este documento, incluyen, pero no se limitan a, uno cualquiera o más de CD5, CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (también denominado subconjunto 1 de CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 y 19A24); BAFF-R, molécula 1 similar a lectina de tipo C (CLL-1 o CLECL1); CD33; MPL; variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRviii); gangliósido G2 (GD2); gangliósido GD3 (aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4)

25 bDGlcP (1-1) Cer); Maduración de células B de miembros de la familia del receptor de TNF (BCMA); Antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAc α -Ser / Thr)); antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA); Receptor receptor huérfano de tipo tirosina quinasa 1 (ROR1); Tirosina quinasa 3 similar a Fms (FLT3); Glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72); CD38; CD44v6; un epítipo de CD43 glicosilado expresado en leucemia aguda o linfoma pero no en progenitores hematopoyéticos, un epítipo de CD43

30 glicosilado expresado en cánceres no hematopoyéticos, antígeno carcinoembrionario (CEA); Molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); Subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2); Mesotelina; Receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre de próstata (PSCA); Proteasa Serina 21 (Testisin o PRSS21); receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); Antígeno de Lewis (Y); CD24; Receptor beta

35 del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); Antígeno embrionario 4 específico de estadio (SSEA-4); CD20; Receptor de folato alfa; Receptor de tirosina-proteína quinasa ERBB2 (Her2 / neu); Mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión de células neurales (NCAM); Prostasa; fosfatasa de ácido prostático (PAP); factor de alargamiento 2 mutado (ELF2M); Efrina B2; proteína de activación de fibroblastos alfa

40 (FAP); receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (receptor de IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); Subunidad de proteasoma (prosome, macrodolor), tipo beta, 9 (LMP2); glicoproteína 100

(gp100); proteína de fusión de oncogén que consta de región de agrupamiento de punto de ruptura (BCR) y homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl); tirosinasa; receptor 2 de efrina tipo A (EphA2); Fucosyl GM1; molécula de adhesión de sialil Lewis (sLe); gangliósido GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDCIalp (1-4) bDGlcp (1-1) Cer); transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2); marcador endotelial tumoral 1 (TEM1 / CD248); relacionado con el marcador endotelial tumoral 7 (TEM7R); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR); Receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D); marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; quinasa del linfoma anaplásico (ALK); Ácido polisálico; 1 específico de placenta (PLAC1); porción de hexasacáridos de globoH glicoceramida (GloboH); antígeno de diferenciación de la glándula mamaria (NY-BR-1); uroplaquina 2 (UPK2); Receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); pannexina 3 (PANX3); Receptor 20 acoplado a proteína G (GPR20); complejo de antígeno de linfocitos 6, locus K 9 (LY6K); Receptor olfativo 51E2 (OR51E2); Proteína del marco de lectura alternativo de TCR gamma (TARP); Proteína del tumor de Wilms (WT1); Antígeno 1 de cáncer / testículo (NY-ES0-1); Antígeno 2 de cáncer / testículo (LAGE-1a); Antígeno asociado a melanoma 1 (MAGE-A1); Gen 6 de variante de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); proteína de esperma 17 (SPA17); Familia de antígenos X, miembro 1A (XAGE1); receptor 2 de la superficie celular de unión a angiopoyetina (Tie 2); antígeno 1 de testículo de cáncer de melanoma (MAD-CT-1); antígeno 2 de testículo de cáncer de melanoma (MAD-CT-2); Antígeno 1 relacionado con Fos; proteína tumoral p53 (p53); mutante p53; prostein; sobreviviente; telomerasa; antígeno 1 del tumor del carcinoma de próstata (PCT A-1 o Galectina 8), antígeno de melanoma reconocido por las células T 1 (MelanA o MART1); Mutante de sarcoma de rata (Ras); transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT); puntos críticos de translocación de sarcoma; inhibidor de la apoptosis del melanoma (ML-IAP); ERG (proteasa transmembrana, gen de fusión de serina 2 (TMPRSS2) ETS); N-acetilglucosaminiltransferasa V (NA17); proteína de caja apareada Pax-3 (PAX3); Receptor de andrógenos; Cyclin B1; homólogo derivado de neuroblastoma de oncogén viral de mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN); Miembro de la familia Ras Homolog C (RhoC); Proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP-2); Citocromo P450 1B 1 (CYP1B 1); Factor de unión a CCCTC (proteína de dedo de zinc) similar (BORIS o hermano del regulador de sitios impresos), antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por células T 3 (SART3); Proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1); proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK); Una proteína de anclaje de quinasa 4 (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto crítico 2 de X (SSX2); Receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE-1); ubicuo renal 1 (RU1); ubicuo renal 2 (RU2); legumain; virus del papiloma humano E6 (HPV E6); virus del papiloma humano E7 (HPV E7); carboxil esterasa intestinal; proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; Receptor 1 similar a inmunoglobulina asociado a leucocitos (LAIR1); Fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89); Miembro 2 de la subfamilia A del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos (LILRA2); Miembro f de la familia de tipo molécula CD300 (CD300LF); Miembro A de la familia 12 del dominio de lectina de tipo C (CLEC12A); antígeno 2 de células estromales de médula ósea (BST2); Receptor de hormona similar a mucina 2 (EMR2) que contiene un módulo similar a EGF; antígeno de linfocitos 75 (LY75); Glypican-3 (GPC3); De tipo receptor Fc 5

(FCRL5); y polipéptido de inmunoglobulina lambda 1 (IGLL1), MPL, biotina, etiqueta de epítipo c-MYC, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, Slea (CA19.9; antígeno de Sialil Lewis) Fucosyl- GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276 / B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGLI1, ALK TCRgamma-delta, NKG2D, CD32 (FCGR2A), CSPG4-HMW-MAVRA, Tim1- / H2VRA -CSFR-alfa), TGFbetaR2, VEGFR2 / KDR, Lews Ag, cadena TCR-beta1, cadena TCR-beta2, cadena TCR-gamma, cadena TCR-delta, FITC, receptor de la hormona luteinizante (LHR), receptor de la hormona estimulante del folículo (FSHR), Receptor de la hormona gonadotropina coriónica (CGHR), CCR4, SLAMF6, SLAMF4, glicoproteína de la envoltura del VIH1, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, hemaglutinina (HA) de la influenza A, GAD, PDL1, guanilil ciclasa C (GHVCC), K -Proteína K8.1, proteína KSHV-gH, autoanticuerpo contra desmogleína 3 (Dsg3), autoanticuerpo contra desmogleína 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP , HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IGE, CD99, RAS G12V, factor tisular 1 (TF1) , AFP, GPRC5D, claudin18.2 (CLD18A2 OR CLDN18A.2), P-glycoprotein, STEAP1, LIV1, NECTIN-4, CRIPTO, MPL, GPA33, BST1 / CD157, canal de cloruro de baja conductancia, Integrin B7, Muc17, C16ORF54, VISTA, Muc5Ac, FCRH5, CLDN6, MMP16, UPK1B, BMPR1B, Ly6E, WISP1 y SLC34A2.

En algunas realizaciones, los antígenos asociados con o específicos de una enfermedad que puede ser el objetivo de los CAR, cuando se expresan solos o con los módulos accesorios como se describe en este documento, incluyen, entre otros, uno o más de 4 -1BB, 5T4, antígeno de adenocarcinoma, alfa-fetoproteína, BAFF, células de linfoma B, antígeno C242, CA-125, anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), C-MET, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22 , CD221, CD23 (receptor de IgE), CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD123, CEA, CINTO888, CTLA-4, DR5, EGFR, EpCAM , CD3, FAP, fibronectina extra dominio B, receptor de folato 1, GD2, gangliósido GD3, glicoproteína 75, GPNMB, HER2 / neu, HGF, quinasa del receptor del factor de dispersión humano, receptor de IGF-1, IGF-I, IgG1, L1- CAM, IL-13, IL-6, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I, integrina $\alpha 5\beta 1$, integrina $\alpha v\beta 3$, LAMP1, MORAb-009, MS4A1, MUC1, mucina CanAg, ácido N-glicolilneuramínico, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, fosfatidilserina, células de carcinoma prostático, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, tenascina C, TGF beta 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, antígeno tumoral CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, vimentina y combinaciones de los mismos. Otros antígenos específicos del cáncer resultarán evidentes para los expertos en la técnica y se pueden usar en conexión con realizaciones alternativas de la divulgación.

En algunas realizaciones, los antígenos asociados con o específicos para el cáncer que pueden ser dirigidos por los CAR, cuando se expresan solos o con los módulos accesorios como se describe en este documento, incluyen, pero no se limitan a, uno o más de BCMA, FLT3, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, STEAP1, CD79b, Integrin B7, Her2, Her3, Liv1, TSHR (Receptor de hormonas estimulantes de la tiroides), PSMA, MSLN (Mesotelina), EGFRviii, Nectin 4, Receptor de prolactina (PRLR), Muc17, Muc5Ac, CD70, CD179b, CDH19, CD16ORF54, VISTA (receptor inmunorregulador V-set o VSIR), GPC3 (glipicano 3), DLL3 (ligando canónico de Notch 3 similar al delta), PTK7, FCRH5 (receptor Fc como 5), LYPD1 (Dominio LY6 / PLAUR que contiene 1), EMR2 (receptor E2 o ADGRE2 acoplado a proteína G de adhesión), gpNMB (glicoproteína nmb), proteína 43 del dedo anular (RNF43), Robo4, CEA, Her3, receptor de folato 1 (FOLR1), CLDN6 (Claudina 6), MMP16 (metalopeptidasa de

matriz 16), uroplaquina 1B (UPK1B), receptor de proteína morfogenética ósea tipo 1B (BMPR1B), Ly6E, WISP1, SLC34A2, Cripto, gpA33, ROR1, CLL1, IL1RAP, BST1, CD133 y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los dominios específicos de antígeno de los CAR son específicos de BCMA, FLT3, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, STEAP1, CD79b, Integrina B7, Her2, Her3, Liv1, TSHR (receptor de hormonas estimulantes de tiroides), PSMA, MSLN (Mesotelina), EGFRviii, Nectina 4, Receptor de prolactina (PRLR), Muc17, Muc5Ac, CD70, CD179b, CDH19, CD16ORF54, VISTA (receptor inmunorregulador V-set o VSIR), GPC3 (glipicano 3), DLL3 (canónico similar al delta) Ligando Notch 3, PTK7, FCRH5 (receptor Fc como 5), LYPD1 (dominio LY6 / PLAUR que contiene 1), EMR2 (receptor E2 o ADGRE2 acoplado a proteína G de adhesión), gpNMB (glicoproteína nmb), proteína 43 del dedo anular (RNF43), Robo4, CEA, Her3, Receptor de folato 1 (FOLR1), CLDN6 (Claudin 6), MMP16 (metalopeptidasa de matriz 16), uroplaquina 1B (UPK1B), receptor de proteína morfogenética ósea tipo 1B (BMPR1B), Ly6E, WISP1, SLC34A2, Cripto, gpA33, ROR1, CLL1, IL1RAP, BST1 y CD133. En algunas realizaciones, los dominios específicos de antígeno de los CAR comprenden secuencias scFv cuyas SEQ ID se establecen en la **Tabla 3**. En algunas realizaciones, los dominios específicos de antígeno de los CAR comprenden secuencias CDR cuyas SEC ID se establecen en la **Tabla 4**.

En varias realizaciones, las células inmunes que expresan los CAR, tanto los CAR convencionales como los de próxima generación (por ejemplo, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), que comprenden estos dominios de unión a antígeno pueden generarse y pueden usarse para terapia celular adoptiva de cáncer, enfermedades infecciosas e inmunes usando métodos conocidos en la técnica y usando métodos descritos en PCT / US2017 / 024843, WO 2014/160030 A2, WO 2016/187349 A1, PCT / US2016 / 058305 y PCT / US17 / 64379, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Un CAR (por ejemplo, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, Tri-TAC, TFP y similares), cuando se usa solo o con módulos accesorios como se describe en la presente, puede comprender un dominio de fijación al antígeno (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se fija a un antígeno que soporta la enfermedad (por ejemplo, un antígeno que soporta la enfermedad como se describe en la presente). En algunas formas de realización, el antígeno que soporta la enfermedad es un antígeno presente en las células que soportan la supervivencia y proliferación de las células que causan la enfermedad. En algunas formas de realización, el antígeno que soporta la enfermedad es un antígeno presente en una célula estromal o una célula supresora derivada de mieloides (MDSC). Las células estromales pueden secretar factores de crecimiento y citocinas para promover la proliferación celular en el microambiente. Las células MDSC pueden bloquear la proliferación y activación de los linfocitos T. Sin desear limitarse a la teoría, en algunas formas de realización, las células que expresan CAR (por ejemplo, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, Tri-TAC, TFP y similares) destruyen las células que soportan la enfermedad, lo que bloquea indirectamente el crecimiento o la supervivencia de las células que causan enfermedades.

En ciertas formas de realización, un antígeno de células estromales se selecciona de uno o más de: antígeno de células estromales de médula ósea 2 (BST2), proteína de activación de fibroblastos (FAP) y tenascina. En una forma de realización, el anticuerpo específico de FAP es, compete por la fijación a, o tiene las mismas CDR que sibrotuzumab. En formas de realización, el antígeno de

MDSC se selecciona de uno o más de: CD33, CD11b, C14, CD15 y CD66b. Por consiguiente, en algunas formas de realización, el antígeno que soporta la enfermedad se selecciona de uno o más de: antígeno de células estromales de médula ósea 2 (BST2), proteína de activación de fibroblastos (FAP) o tenascina, CD33, CD11b, C14, CD15 y CD66b.

5 En otra realización, cada región específica de antígeno del CAR (por ejemplo, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) puede comprender un fragmento variable monocatenario divalente (o bivalente) (di-scFvs, bi-scFv). En algunas realizaciones, los CAR (por ejemplo, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que comprenden al menos dos regiones de direccionamiento específicas de antígeno expresarían dos scFv específicos para cada uno de los dos antígenos. El ASD resultante se
10 une al dominio coestimulador y al dominio de señalización intracelular a través de una región bisagra y un dominio transmembrana. Un ejemplo de CAR (un zSIR) que se dirige a dos antígenos está representado por SEQ ID NO: 3962 y se dirige a CD19 y CD123.

En una realización adicional, cada ASD del CAR comprende un diacuerpo.

En algunas realizaciones, el ASD del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) comprende fragmentos V_L cuyas SEQ ID y antígenos diana se enumeran en la **Tabla 3**.
15

En algunas realizaciones, el ASD del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) comprende fragmentos V_H cuyas SEQ ID y antígenos diana se enumeran en la **Tabla 3**.
20

En algunas realizaciones, el ASD del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) comprende fragmentos scFvs cuyas SEQ ID y antígenos diana se enumeran en la **Tabla 3**.
25

En una realización, un dominio específico de antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de fragmentos v_L y v_H dirigidos a este antígeno cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 4**.
30

En una realización, un dominio específico de antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de los fragmentos v_L y v_H de scFv dirigidos a este antígeno cuyas SEQ ID se enumeran en las Tablas 4.
35

En algunas realizaciones, el ASD del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) comprende fragmentos VHH (nanocuerpos).

En una realización, un dominio específico de antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión a antígeno de un andamio de no inmunoglobulina dirigido a este antígeno.
40

En una realización, un dominio específico de antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión al antígeno de un receptor conocido por unir este antígeno diana.

En una realización, un dominio específico de unión a antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión a antígeno de un ligando conocido para unirse a este antígeno diana.

La divulgación demuestra que los CAR que se dirigen al mismo antígeno pueden tener diferentes propiedades biológicas dependiendo del epítipo particular del antígeno al que se unen. Por tanto, dos CAR dirigidos a CD19 (por ejemplo, SEQ ID NO: 916 y 818) pueden tener diferentes propiedades biológicas (por ejemplo, citotoxicidad, proliferación o secreción de citocinas, etc.) dependiendo de los diferentes epítopos de CD19 a los que se unen. En una realización, la divulgación proporciona CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que se unen al mismo epítipo en los diferentes objetivos enumerados en las **Tablas 3** como cualquiera de los CAR (es decir, CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación que tienen la capacidad de competir de forma cruzada para vincularse a los diferentes objetivos con cualquiera de las CAR de la divulgación. En algunas realizaciones, los dominios específicos de antígeno de estos CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) podrían derivarse de fragmentos vL, fragmentos vH o fragmentos scFv de anticuerpos. En algunas realizaciones, los anticuerpos de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar el epítipo diana reconocido por un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son scFvs dirigidos ese antígeno y que tiene secuencias como se muestra en las SEQ ID NO: 4266-4338, 9693-9722 y 11468-11470 (Tabla 3). En una realización ejemplar, la referencia scFv BCMA-Am14-HL representada por SEQ ID NO: 4266 puede usarse en estudios de competencia cruzada para determinar el epítipo diana reconocido por los CAR basados en BCMA-Am14-HL y las cadenas principales de la divulgación. En algunas realizaciones, las CAR de referencia para estudios de competencia cruzada contra diferentes objetivos son CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) cuyas SEQ ID se muestran en la **Tabla 7**.

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítopos diana reconocidos por los CAR dirigidos a CD19 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son scFv que tienen secuencias como se muestra en SEQ ID NOS: 4269-4270, 4272, 4298, 4299, 4338, 14462 (**Tabla 3**).

En una realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítopos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CD19 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y el like) de la divulgación son CAR que se dirigen a CD19 y que tienen ID de SEC 4830-4871, 4781-4829, 4872-4920, 4732-4780, 4683-4731, 4970-5018, and 4921-4969 (Tabla 7).

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítopos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CD20 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son scFv dirigidos a CD20 y que tienen las SEQ ID que se enumeran en la **Tabla 3**.

En una realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítopos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CD20 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y el like) de la divulgación son CAR que se dirigen a CD20 y que tienen ID de SEC como se enumeran en la **Tabla 7**.

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítopos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CD22 (por ejemplo, CAR I,

CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son scFv dirigidos a CD22 y que tienen las SEQ ID 14449-14458, 14460, 14469-70 como se enumeran en la **Tabla 3**.

En una realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CD22 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y el like) de la divulgación son CAR que se dirigen a CD22 y que tienen ID de SEC como se enumeran en la **Tabla 7**.

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a BAFF-R (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son scFv dirigidos a BAFF-R y que tienen las SEQ ID: 14465-14467 como se enumera en la **Tabla 3**.

En una realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a BAFF-R (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y el like) de la divulgación son CAR que se dirigen a BAFF-R y que tienen ID de SEC como se enumeran en la **Tabla 7**.

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada contra CAR que se dirigen a DLL3 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son scFv que se dirigen a DLL3 y que tienen SEQ ID como se enumera en la **Tabla 3**.

En una realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada contra los CAR que se dirigen a DLL3 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son CAR que se dirigen a DLL3 y que tienen las SEQ ID que se enumeran en la **Tabla 7**.

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada contra CAR que se dirigen a PTK7 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son scFv que se dirigen a PTK7 y que tienen SEQ ID como se enumera en la **Tabla 3**.

En una realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada contra los CAR que se dirigen a PTK7 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son CAR que se dirigen a PTK7 y que tienen las SEQ ID que se enumeran en la **Tabla 7**.

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a MSLN (mesotelina) (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y el like) de la divulgación son scFv dirigidos a MSLN y que tienen las SEQ ID como se enumeran en la **Tabla 3**.

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a MSLN (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 4284-4285, 4293-4295, 9715 y 9716.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a MSLN (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son CAR que se dirigen a MSLN y que tienen ID de SEC como se enumeran en la **Tabla 7**.

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a Her2 (por ejemplo, CAR I, CAR II,

SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y el like) de la divulgación son scFv dirigidos a Her2 y que tienen las SEQ ID como se enumeran en la **Tabla 3**.

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a Her2 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 4276-4279.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a Her2 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son Her2-CAR con SEQ ID NO: 6244-6292, 6391-6439, 6342-6390 y 6293-6341 (**Tabla 7**).

En una realización, el scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a TSHR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación es scFv dirigido a TSHR y que tiene la SEQ ID: 4280 como se enumera en la **Tabla 3**.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a TSHR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son TSHR-CAR con SEQ ID NO: 7567-7615 (**Tabla 7**).

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a EGFRviii (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son scFv dirigidos a EGFRviii y que tienen las SEQ ID como se enumeran en la **Tabla 3**.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a EGFRviii (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son EGFRviii -CAR con SEQ ID NO: 5607-5655, 5705-5753, 5754-5802 y 5656-5704.

En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a PRLR (receptor de prolactina) (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son scFv que se dirigen a PRLR (Receptor de prolactina) y que tienen las SEQ ID como se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a PRLR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 4296 y 4309. En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a PRLR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son PRLR CAR con SEQ ID NOs: 7077-7125 y 7126-7174 como se enumeran en la **Tabla 7**.

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a PSMA (antígeno prostático específico de membrana) (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR), TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 7273-7321, 7224-7272 y 7175-7223) son los scFv dirigidos a

PSMA enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4281-4283). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a PSMA (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representados por SEQ ID NO: 4281-4283.

5 En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a PSMA (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR de PSMA enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 7273-7321, 7224-7272 y 7175-7223).

10 En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a DLL3 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los scFv dirigidos a DLL3 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4290-4291).

15 En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a FOLR1 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la descripción (por ejemplo, SEQ ID NO: 5999-6047 y 6048-6096) son los scFv dirigidos a FOLR1 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4323-4324). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a FOLR1 de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 5999-6047 y 6048-6096).

20 En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a GPC3 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la descripción (por ejemplo, SEQ ID NO: 6097-6145 y 6146-6194) son los scFv dirigidos a GPC3 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4307-4308). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a GPC3 de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 6097-6145 y 6146-6194).

25 En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a WISP1 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la descripción (por ejemplo, SEQ ID NO: 7812-7860 y 7861-7909) son los scFv dirigidos a WISP1 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4335 y 4336). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a WISP1 de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 7812-7860 y 7861-7909.

30 En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a EMR2 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 5803-5851, 5852-5900 y 5901-5949) son los scFv dirigidos a EMR2 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4313, 4314 y 4315). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a EMR2 de la divulgación están representados por SEQ ID NO: 4803-5851, 585-5900, 5901-5949.

40

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a UPK1B (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 7616-7664, 7665-7713) son los scFv dirigidos a UPK1B listados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4328 y 4329).

5 En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a UPK1B de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 7616-7664, 7665-7713.

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a BMPR1B (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la descripción (por ejemplo, SEQ ID NO: 4536-4584, 4585-4633) son los scFv dirigidos a BMPR1B enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4330 y 4331). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a BMPR1B de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 4536-4584, 4585-4633.

15 En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a BMPR1B (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR de BMPR1B enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4536-4584, 4585-4633).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CDH19 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 5264-5312, 5313-5361) son los scFv dirigidos a CDH19 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4302 y 4303). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CDH19 de la divulgación están representados por SEQ ID NO: 5264-5312, 5313-5361.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CDH19 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR CDH19 enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 5264-5312, 5313-5361).

30 En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a VISTA de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 7763-7811, 7714-7762) son los de VISTA- dirigidos a scFv enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4305 y 4306). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a VISTA (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representadas por las SEQ ID NO: 7763-7811, 7714-7762.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a VISTA (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR de VISTA enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 7763-7811, 7714-7762).

En otra realización, el scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a IL13Ra2 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son IL13Ra2 scFv enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 14448).

5 En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a IL13Ra2 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR de IL13Ra2 enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 15857-15909).

10 En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a FLT3 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la descripción (por ejemplo, SEQ ID NO: 10606-10654, 10557-10605) son los scFv dirigidos a FLT3 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 9710 y 9711). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a FLT3 (por ejemplo, CAR I, CAR
15 II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representadas por las SEQ ID NO: 10557-10605, 10606-10654.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a FLT3 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son FLT3 CAR que se enumeran en la **Tabla**
20 **7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 10557-10605, 10606-10654).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a CLDN6 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 5411-5459, 5460-5508) son los scFv dirigidos a CLDN6 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4325 y
25 4326). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CLDN6 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representadas por las SEQ ID NO: 5411-5459, 5460-5508.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CLDN6 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR CLDN6 enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 5411-5459, 5460-5508).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a ROBO4 (por ejemplo, CAR I, CAR
35 II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 7420-7468) son los scFv dirigidos a ROBO4 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4320). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a ROBO4 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 7420-7468.

40 En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a ROBO4 (por ejemplo, CAR I,

CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los ROBO4 CAR enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 7420-7468).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a IL1RAP (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la descripción (por ejemplo, SEQ ID NO: 10802-10850, 10851-10899, 10900-10948) son los scFv dirigidos a IL1RAP enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 9712, 9713 y 9714). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a IL1RAP (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representadas por las SEQ ID NO: 10802-10850, 10851-10899, 10900-10948.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a IL1RAP (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR IL1RAP enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 10802-10850, 10851-10899, 10900-10948).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR dirigidos a CD22 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 5068-5115, 10361-10409) son los scFv dirigidos a CD22 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4271, 9693, 12502). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CD22 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representadas por las SEQ ID NO: 5068-5115, 10361-10409.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CD22 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR CD22 enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 5068-5115, 10361-10409).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CLL1 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la descripción (por ejemplo, SEQ ID NO: 10459-10507, 10410-10458) son los scFv dirigidos a CLL1 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 9708 y 9703). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CLL1 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 10410-10458, 10459-10507.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CLL1 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR CLL1 enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 10410-10458, 10459-10507).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a BST1 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 10116-10164,

10165-10212, 10213-10262) son los scFv dirigidos a BST1 listados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 9718, 9719 y 9720). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a BST1 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representadas por las SEQ ID NO: 10116-10164, 10165-10212, 10213-10262.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a BST1 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son CAR BST1 enumeradas en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 10116-10164, 10165-10212, 10213-10262).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a NECTIN-4 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y el similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 7028-7076, 11096-11242) son los scFv dirigidos a NECTIN-4 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 4292, 9696). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a NECTIN-4 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación está representada por las SEQ ID NO: 7028-7076, 11096-11242.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a NECTIN-4 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y el similares) de la divulgación son los CAR de NECTIN-4 enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 7028-7076, 11096-11242).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a GPA33 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 10655-10703) son los scFv dirigidos a GPA33 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 9698). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a GPA33 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representadas por las SEQ ID NO: 10655-10703.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a GPA33 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR de GPA33 enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 10655-10703).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a ROR1 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 11145-11193) son los scFv dirigidos a ROR1 enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 9699). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a ROR1 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representadas por las SEQ ID NO: 11145-11193.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a ROR1 (por ejemplo, CAR I,

CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CAR ROR1 enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 11145-11193).

En otra realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CRIPTO (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 10508-10556) son los scFv dirigidos a CRIPTO enumerados en la **Tabla 3** (por ejemplo, SEQ ID NO: 9697). En una realización, los scFv de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CRIPTO (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación están representados por las SEQ ID NO: 10508-10556.

En otra realización, los CAR de referencia para estudios de competencia cruzada para determinar los epítomos diana reconocidos por los CAR que se dirigen a CRIPTO (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación son los CRIPTO CAR enumerados en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 10508-10556).

En algunas realizaciones, dos o más dominios funcionales de los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) como se describe en el presente documento, están separados por uno o más enlazadores. Los enlazadores son regiones de oligo o polipéptidos de aproximadamente 1 a 100 aminoácidos de longitud, que unen cualquiera de los dominios / regiones del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación. En algunas formas de realización, los ligadores pueden tener, por ejemplo, 5-12 aminoácidos de longitud, 5-15 aminoácidos de longitud o 5-20 aminoácidos de longitud. Los ligadores pueden estar compuestos de residuos flexibles como glicina y serina, de modo que los dominios de proteínas adyacentes pueden moverse libremente entre sí. Los ligadores más largos, por ejemplo, aquellos de más de 100 aminoácidos, pueden usarse en conexión con formas de realización alternativas de la divulgación, y pueden seleccionarse para, por ejemplo, asegurar que dos dominios adyacentes no interfieran estéricamente entre sí. Las SEQ ID NOs de varios enlazadores ejemplares se enumeran en la Tabla 5 (ver, por ejemplo, SEQ ID NOs: 4007 a 4012).

En algunas realizaciones, los CAR (que forman parte de las cadenas principales) descritos en el presente documento comprenden una región de bisagra o enlazadora entre el dominio específico de antígeno y el dominio transmembrana. En algunas realizaciones, la región bisagra comprende uno o más de CD8a humano o un fragmento Fc de un anticuerpo o un equivalente funcional, fragmento o derivado del mismo, una región bisagra de CD8a humano o un anticuerpo o un equivalente funcional, fragmento o derivado del mismo, una región CH2 de un anticuerpo, una región CH3 de un anticuerpo, una secuencia espaciadora artificial y combinaciones de estos. En realizaciones ejemplares, la región de bisagra comprende uno o más de (i) una región de bisagra, CH2 y CH3 de IgG4, (ii) una región de bisagra de IgG4, (iii) una región de bisagra y CH2 de IgG4, (iv) una región de bisagra de CD8α, (v) una región de bisagra, CH2 y CH3 de IgG1, (vi) una región de bisagra de IgG1, (vi) una región de bisagra y CH2 de IgG1, o (vii) combinaciones de estos.

Como se describe en este documento, los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) (que forman parte de las cadenas principales) descritos en este documento comprenden un dominio transmembrana. El dominio transmembrana puede comprender la secuencia transmembrana de cualquier proteína que tenga un dominio transmembrana, incluyendo cualquiera de

las proteínas transmembrana de tipo I, tipo II o tipo III. El dominio transmembrana del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación también puede comprender una secuencia hidrófoba artificial. Los dominios transmembrana de los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) descritos en este documento pueden seleccionarse de modo que el dominio transmembrana no se dimerice. En algunas realizaciones, el CAR codificado por TMD (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que comprende cualquiera de las cadenas principales descritas en este documento comprende un dominio transmembrana seleccionado del dominio transmembrana de un alfa, cadena beta o zeta de un receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI Ic, 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), CULPA (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG / Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D y / o NKG2C.

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 deriva la transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y / o uno o más aminoácidos adicionales asociados con la región intracelular de la proteína de la que se deriva la proteína transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). En un aspecto, el dominio transmembrana es contiguo con uno de los otros dominios del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). En una realización, el dominio transmembrana puede ser de la misma proteína de la que se deriva el dominio de señalización, el dominio coestimulador o el dominio bisagra. En otro aspecto, el dominio transmembrana no se deriva de la misma proteína de la que se deriva cualquier otro dominio del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares).

Como se describe en el presente documento, los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) (que forman parte de las cadenas principales) descritos en el presente documento comprenden un dominio de señalización intracelular. Este dominio puede ser citoplásmico y puede transducir la señal de la función efectora y dirigir a la célula para que realice su función especializada. Los ejemplos de dominios de señalización intracelular incluyen, entre otros, ζ cadena del receptor de linfocitos T o cualquiera de sus homólogos (por ejemplo, η cadena, cadenas CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , Fc ϵ R1 γ y β , cadena MB1 (Ig α), B29 (Ig β), etc.), polipéptidos CD3 (Δ , δ y ϵ), tirosina quinasas de la familia syk (Syk, ZAP 70, etc.), tirosina quinasas de la familia src (Lck, Fyn, Lyn, etc.) y otras moléculas involucradas en la transducción de linfocitos T, tales como CD2, CD5 y CD28. Específicamente, el dominio de señalización intracelular puede ser cadena zeta CD3 humana, Fc γ RIII, Fc ϵ RI, colas citoplasmáticas de receptores Fc, motivo inmunorreceptor de activación a base de tirosina (ITAM) que porta receptores citoplásmicos o combinaciones de estos. Los dominios de señalización intracelular adicionales serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio y pueden ser usados

en conexión con formas de realización alternativas de la invención. En algunas formas de realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización de uno o más de una cadena zeta CD3 humana, FcγRIII, FcεRI, una cola citoplasmática de un receptor Fc, un motivo inmunorreceptor de activación a base de tirosina (ITAM) que porta receptores citoplásmicos, y combinaciones de estos.

Como se describe en este documento, los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) (que forman parte de las cadenas principales) descritos en este documento comprenden un dominio coestimulador. En formas de realización ejemplares, el dominio coestimulador comprende un dominio de señalización de uno cualquiera o más de CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 y combinaciones de los mismos.

Los enlazadores escindibles como se describen en el presente documento incluyen enlazadores 2A (por ejemplo T2A), enlazadores de tipo 2A o equivalentes funcionales de los mismos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los enlazadores incluyen el enlazador picornaviral de tipo 2A, secuencias CHYSEL de teschovirus porcino (P2A), virus Thossea asigna (T2A) o combinaciones, variantes y equivalentes funcionales de los mismos. En otras realizaciones, las secuencias enlazadoras pueden comprender el motivo Asp-Val / Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly (2A) -Pro (2B), que da como resultado la escisión entre la glicina 2A y la prolina 2B. Las secuencias nucleicas de varios enlazadores escindibles ejemplares se proporcionan en SEQ ID NO: 80 a SEQ ID NO: 85 y las secuencias de aminoácidos de varios enlazadores ejemplares se proporcionan en SEQ ID NO: 4079 a SEQ ID NO: 4084. Otros enlazadores serán evidentes para los expertos en la técnica y puede usarse en conexión con realizaciones alternativas de la divulgación. En una realización, también se añade un motivo Ser-Gly-Ser-Gly (SGSG) (SEQ ID NO: 931-932 y SEQ ID NO: 4844-4845) cadena arriba de las secuencias del enlazador escindible para mejorar la eficacia de la escisión. Un inconveniente potencial de los enlazadores escindibles es la posibilidad de que la pequeña etiqueta 2A que queda al final de la proteína N-terminal pueda afectar la función de la proteína o contribuir a la antigenicidad de las proteínas. Para superar esta limitación, en algunas realizaciones, se añade un sitio de escisión de furina (RAKR) (SEQ ID NO: 88-90 y 4087-4089) corriente arriba de los motivos SGSG para facilitar la escisión del péptido 2A residual después de la traducción. En una realización, se colocan enlazadores escindibles entre el polipéptido que codifica el CAR y el polipéptido que codifica los módulos accesorios. La escisión en el sitio del enlazador escindible da como resultado la separación de los dos polipéptidos.

Los "módulos accesorios" como se usan en este documento se refieren a agentes que mejoran, reducen o modifican la actividad de las células T que expresan los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) o reducir la toxicidad asociada con los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de modo que se mejore la respuesta terapéutica de los CAR. Un módulo accesorio también puede mejorar la transferencia génica y / o la expresión del casete que codifica CAR en las células diana, por ejemplo, una célula efectora inmunitaria.

En algunas realizaciones, los vectores que comprenden polinucleótidos que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) pueden comprender además polinucleótidos que codifican proteínas de señalización viral y celular que (i) extienden la vida útil de las células T que expresan los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), (ii)

estimulan la proliferación de células T y / o (iii) protegen las células T que expresan los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la apoptosis; (iv) potenciar el empaquetamiento, la transferencia génica y / o la expresión de construcciones CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). En realizaciones ejemplares, tales proteínas incluyen, pero no se limitan a, vFLIP-K13 (SEQ ID NO (ADN): 108; SEQ ID NO (PRT): 4107) del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi y Vif del VIH-1 (SEQ ID NO: 118 y 4117).

En una realización, los vectores que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) codifican además vFLIP-K13. En una realización, la secuencia de nucleótidos de vFLIP-K13 tiene codones optimizados. Un ejemplo de CAR (es decir, SIR) que coexpresa el codón optimizado vFLIP K13 está representado por SEQ ID NO: 14057. En una realización, los vectores que codifican CAR codifican además Vif del VIH-1. En una realización alternativa, los vectores que codifican CAR codifican además tanto vFLIP K13 como VIH-1 Vif.

En algunas realizaciones, las moléculas accesorias están codificadas por vectores que son distintos de los vectores que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las células efectoras que comprenden vectores que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) también comprenden vectores que codifican moléculas accesorias. En algunas realizaciones, las moléculas accesorias se codifican modificando el locus genómico que codifica la proteína endógena correspondiente.

En algunas realizaciones, los vectores que comprenden polinucleótidos que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) comprenden además polinucleótidos que codifican ARNip o scFv específicos para citocinas. En realizaciones ejemplares, las citocinas son una cualquiera o más de IL-10, IL-6, IFN o combinaciones de los mismos. En alguna realización, los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) se coexpresan con un fragmento de anticuerpo biespecífico secretado que se une al receptor α de IL6 y albúmina de suero humano. En alguna realización, los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) se coexpresan con un fragmento scFv secretado que se une a IL6. En algunas realizaciones, los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) se coexpresan con el péptido FX06 para mitigar la fuga capilar asociada con la terapia CAR.

En realizaciones adicionales, los vectores que comprenden polinucleótidos que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) comprenden además polinucleótidos que codifican ARNip o una nucleasa que se dirige al TCR- α endógeno, TCR- β , TCR- γ , TCR-delta, CD3gamma, CD3zeta, CD3epsilon, CD3-delta. En realizaciones adicionales, los polinucleótidos que codifican ARNip o una nucleasa que se dirige al TCR- α , TCR- β , TCR- γ , TCR-delta, CD3gamma, CD3zeta, CD3epsilon, CD3-delta endógenos están codificados por vectores distintos de los vectores que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares).

En realizaciones adicionales, los vectores que comprenden polinucleótidos que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) comprenden además polinucleótidos que codifican un marcador seleccionable. En una realización ejemplar, el marcador seleccionable puede codificar un gen de resistencia a fármacos, tal como un gen que confiere resistencia a inhibidores de puromicina o calcineurina (por ejemplo, CNB30). En alguna realización, el

marcador seleccionable puede codificar dominios extracelulares y transmembrana de CD30, CD20, CD19 humanos (SEQ ID NO: 96 y 4095), BCMA (SEQ ID NO: 97 y 4096), EGFR (SEQ ID NO: 95 y 4094), CD34 o cualquier proteína o fragmento de proteína que se exprese en la superficie celular y pueda ser reconocido por un anticuerpo que pueda usarse para eliminar células que expresan su antígeno diana. En una realización ejemplar, se usa cetuximab, un monoclonal anti-EGFR para eliminar las células que expresan CAR de la divulgación que coexpresan un EGFR truncado. Los marcadores seleccionables se pueden usar para enriquecer las células que expresan el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), para seleccionar las células que expresan altos niveles de CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y / o para reducir la diversidad clonal de las células que expresan el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). En realizaciones adicionales, los polinucleótidos que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) pueden codificar etiquetas de epítipo (por ejemplo, Etiqueta Myc) que se expresan en el dominio extracelular de las CAR. (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y se puede usar para enriquecer las células que expresan CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), para seleccionar células que expresan altos niveles de CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y / o para reducir la diversidad clonal de las células que expresan el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). La reducción de la diversidad clonal de las células T alogénicas que expresan los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) conducirá a su vez a una reducción de la incidencia de enfermedad de injerto contra huésped (EICH), por lo que permitiendo el uso de células T alogénicas para la terapia con células CAR-T.

Debe observarse que los módulos accesorios son opcionales para la actividad de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). Los polipéptidos y polinucleótidos de varios ejemplos de construcciones de CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) (es decir, cadenas principales) en la Tabla 6 y la Tabla 7 contienen módulos accesorios tales como PAC, K13 y / o hNEMO-K277A-Flag. En realizaciones alternativas de la divulgación, estas construcciones CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) se pueden usar sin la presencia de los módulos accesorios y el revestimiento divisible intermedio (por ejemplo, P2A o F2A o T2A).

En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona una nueva plataforma de receptores inmunes sintéticos, denominados zSIR, que contienen dos cadenas CD3z. Las secuencias de ácido nucleico de las cadenas CD3z que se pueden usar en la construcción de zSIR se proporcionan en SEQ ID NO: 67 y 71. Las correspondientes secuencias de aminoácidos se proporcionan en SEQ ID NO: 4066 y 4070, respectivamente. La divulgación establece que el fragmento vL de un anticuerpo puede unirse a una de las dos cadenas CD3z y el fragmento vH puede unirse a la otra cadena CD3z. Cuando las dos cadenas de este tipo (por ejemplo, vL-CD3z y vH-CD3z) se coexpresan en la misma célula, los fragmentos vL y vH pueden unirse a su antígeno afín y transmitir una señal de célula T. En particular, las células T que expresan tal zSIR cuando se exponen a una línea celular que expresa el antígeno diana afín pueden activar la señalización de NFAT, inducir la producción de IL2, promover la proliferación de las células T, promover la activación de las células T y ejercer citotoxicidad. La expresión y actividad de zSIR se puede incrementar aún más mediante la incorporación de un enlazador

entre los fragmentos vL / vH y CD3z. En particular, los dominios IgCL (SEQ ID NO (DNA): 28 y SEQ ID NO (PRT): 4027) e IgCH (SEQ ID NO (DNA): 29 y SEQ ID NO (PRT): 4028) derivados de anticuerpos sirven como enlazadores útiles entre los fragmentos vL / vH y CD3z.

En otra realización, también se incorpora un dominio coestimulador en la (s) cadena (s) CD3z de zSIR. Los dominios coestimuladores ejemplares incluyen dominios coestimuladores de 41BB y CD28. Las cadenas CD3z que contienen dominios coestimuladores 41BB y CD28 se presentan en SEQ ID NO: 4076, 4078 y 4075, 4077, respectivamente (Tabla 5). En conjunto, los resultados anteriores proporcionan una plataforma novedosa para la terapia celular adoptiva que supera algunas de las limitaciones de diseño de SIR y también proporciona un enfoque complementario a los SIR.

Las dos cadenas de zSIR descritas en el presente documento pueden estar codificadas por una única cadena de polinucleótidos y traducidas en una única cadena de polipéptidos, que posteriormente se escinde en diferentes proteínas. Las dos cadenas de zSIR descritas en el presente documento pueden expresarse usando dos promotores distintos y codificadas por dos cadenas polinucleotídicas separadas. Las dos cadenas de zSIR descritas en el presente documento pueden estar codificadas por un solo vector. Las dos cadenas de zSIR descritas en este documento pueden estar codificadas por dos vectores diferentes. La molécula de ácido nucleico que codifica un zSIR puede comprender una o más secuencias líder (también conocidas como péptido señal). En una realización, cada unidad funcional (por ejemplo, Un dominio de unión a antígeno unido a una cadena CD3z más un enlazador escindible Furine-SGSG) de un zSIR puede estar precedido por una secuencia líder que dirige el zSIR a la superficie celular como una transmembrana de tipo I proteína. En una realización, el dominio de unión a antígeno de zSIR está orientado hacia extracelular. En algunas realizaciones, la secuencia líder comprende la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4 y secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4000 a SEQ ID NO: 4003. En algunas realizaciones, secuencias cortas de ácido nucleico (3- 9 ácidos nucleicos) que comprenden sitios de enzimas de restricción se localizan entre las diferentes subunidades de un zSIR, por ejemplo, entre una secuencia señal y el dominio de unión al antígeno del zSIR o entre la unión al antígeno y la cadena CD3z.

Se proporcionan en el presente documento uno o más polipéptidos codificados por una o más moléculas de ácido nucleico que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) 1 a 15 (**Tabla 1**) o cualquiera o más de las cadenas principales 1-60 descritas en el presente documento (**Tabla 2**).

En algunas realizaciones, el dominio específico de antígeno de los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) es específico para uno, dos, tres o más antígenos en células diana, tales como células cancerosas. Como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, cada componente del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) es contiguo y en el mismo marco de lectura con los demás componentes del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). En algunas realizaciones, si la estructura que comprende CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) comprende más de un dominio específico de antígeno, cada uno de los dominios específicos de antígeno es contiguo y en el mismo marco de lectura que los otros dominios específicos de antígeno en el mismo CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares).

También se proporcionan en el presente documento uno o más polipéptidos codificados por una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el esqueleto-1 que comprende CAR I y K13-vFLIP como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el dominio específico de antígeno del CAR que comprende el esqueleto-1 es específico para uno, dos, tres o más antígenos en células diana, tales como células cancerosas. Como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, cada componente del CAR es contiguo y en el mismo marco de lectura con cada uno de los demás componentes del CAR que comprende la cadenas principales-1. En algunas realizaciones, el CAR que comprende el esqueleto-1 comprende más de un dominio específico de antígeno, cada uno de los dominios específicos de antígeno son contiguos y en el mismo marco de lectura que los otros dominios específicos de antígeno en el mismo CAR.

También se proporcionan en este documento uno o más polipéptidos codificados por una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el esqueleto-8 que comprende CAR II (CAR 2) y Vif de VIH-1 como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el dominio específico de antígeno del CAR que comprende la cadena principal 8 es específico de uno, dos, tres o más antígenos en las células diana, tales como células cancerosas. Como se describe en el presente documento, cada componente del CAR es contiguo y en el mismo marco de lectura con cada uno de los demás componentes del CAR. En algunas realizaciones, en el CAR que comprende el esqueleto-8 comprende más de un dominio específico de antígeno, cada uno de los dominios específicos de antígeno son contiguos y en el mismo marco de lectura que los otros dominios específicos de antígeno en el mismo CAR.

En diversas realizaciones, los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que forman parte de las CAR 1 a 15 (ver, **Tabla 1**) o parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, tales como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, comprenden dos, tres o más dominios específicos de antígeno.

En varias realizaciones, los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que forman parte de las CAR 1 a 15 (ver, **Tabla 1**) o parte de las cadenas principales descritas en este documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, comprenden dos, tres o más dominios coestimuladores.

En varias realizaciones, los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de las CAR 1 a 15 (ver, **Tabla 1**) o parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, comprenden cero, uno, dos, tres o más dominios de señalización intracelular.

En diversas realizaciones, los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que forman parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, tales como esqueleto-1, esqueleto-2, esqueleto-32 o esqueleto-60, comprenden una, dos, tres o más proteínas de señalización virales y / o celulares.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican los componentes deseados de los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) descritas en el presente documento se pueden obtener usando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, cribando bibliotecas de células que expresan la molécula de ácido nucleico, derivando la molécula de ácido nucleico de un vector que se sabe que incluye la misma, o aislando directamente de células y tejidos que la contienen, usando técnicas estándar. Alternativamente, el ácido nucleico de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que forman parte de las CAR 1 a 15. (ver, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, donde el dominio específico de antígeno de los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) es específico para el objetivo como se describe en la **Tabla 3**.

En una realización, un dominio específico de antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión al antígeno, por ejemplo, CDR, de fragmentos vL y vH dirigidos a este antígeno cuya SEQ ID se muestra en las **Tablas 3 y 4**.

En una realización, un dominio específico de antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de fragmentos de vHH dirigidos a este antígeno.

En una realización, un dominio específico de antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión a antígeno de una no inmunoglobulina andamio dirigido a este antígeno.

En una realización, un dominio específico de antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión al antígeno de un receptor conocido por unir este antígeno diana.

En una realización, un dominio específico de antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión al antígeno de un ligando conocido por unir este antígeno diana.

En una realización, un dominio específico de antígeno de un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) contra un antígeno diana es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de fragmentos vL y vH de un scFV dirigido a este antígeno cuya SEQ ID se muestra en la **Tabla 3**. Las SEQ ID NO de las CDR se muestran en la **Tabla 4**.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR son específicos de las dianas mostradas en la **Tabla 3**.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CD19.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CD20.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CD22.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para BCMA.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Integrin B7.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Her2.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena

principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para TSHR.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para PSMA.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para MSLN.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para EGFR viii.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para DLL3.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Nectin-4.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Receptor de prolactina (PRLR).

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las

cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Muc17.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CD70.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Receptor de prolactina CDH19.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CD16ORF54.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para VISTA.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para GPC3.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Muc5Ac.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-

TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para FCRH5.

5 En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para LYPD1

10 En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para EMR2.

15 En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para gpNMB.

20 En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para RNF43.

25 En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CD44v6.

30 En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Robo4.

35

40

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CEA.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Her3.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para FOLR1.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CLDN6.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para MMP16.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para UPK1B.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena

principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para BMPR1B.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Ly6E.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CD79b.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para WISP1.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para SLC34A2.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Liv1.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para Cripto.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las

cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para gpA33.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para ROR1.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CLL1.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para FLT3.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para IL1RAP.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para BST1.

En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que son parte de CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o son parte de las cadenas principales descritas en la presente, tales como cadena principal 1, cadena principal 2, cadena principal 32, o cadena principal 60, en donde el dominio específico de antígeno de los CAR es específico para CD133.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD200R.

5 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD276.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD324.

10 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CS1.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de ALK1.

15 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de ROR1.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CDH6

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CDH16.

25 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CDH17.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de Receptor de folato beta.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CLEC5A.

35 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de NY-ESO/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-

40

15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de WT1/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de AFP/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de HPV16-E7/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de gp100/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de hTERT/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de MART1/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de HTLV1-Tax/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de PR1/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de HIV1-gag/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de gp120 que envuelven al VIH1

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-

15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de PTK7.

5 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de TROP2.

10 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de BAFF-R.

15 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de LAMP1.

20 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de Tim1.

25 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de TCR gamma-delta.

30 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (véase, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de la cadena constante beta1 de TCR.

35 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (véase, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de la cadena constante beta2 de TCR.

40 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de GCC.

45 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de B7H4.

50 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-

15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de LHR.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de Tn-Muc1.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de TSLPR.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (véase, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos del factor tisular.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de SSEA-4.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de SLea.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de Muc1/MHC complejo de clase I.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de Muc16.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de NYBR-1.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de IL13Ra2.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-

15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de IL11Ra.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de L1CAM.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de EpCAM1.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de gpNMB.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de GRP78.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de GPC3.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de GRPC5D.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de GFRa4.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de FITC.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de CD79b.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-

15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de Lym1.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de Lym2.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de CLD18A2.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos del epítipo CD43 expresado en células de leucemia.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los zSIR que forman parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en los que los dominios específicos de antígeno son específicos de CD179a.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1-6 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**) o son parte de los esqueletos descritos en el presente documento tales como esqueleto-1, esqueleto-2, esqueleto-32 o esqueleto-60, en el que el dominio específico de antígeno es como se describe en la **Tabla 3**.

En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico que codifica CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y / o moléculas accesorias descritas en la presente se proporciona como un transcrito de ARN mensajero (mARN). En otra realización, la molécula de ácido nucleico que codifica los CAR y / o las moléculas accesorias descritas en el presente documento se proporciona como una construcción de ADN.

También se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos en este documento. En algunas realizaciones, los vectores son vectores virales. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, un adenovirus, un virus adenoasociado, un lentivirus, un virus de la viruela, un vector de virus del herpes o un vector de transposón de la bella durmiente. En varias realizaciones, la divulgación incluye construcciones de vectores retrovirales y lentivirales que expresan el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y las moléculas accesorias que pueden transducirse directamente en una célula.

La divulgación también incluye un constructo de ARN que puede transfectarse directamente en una célula. Un método para generar mARN para el uso en la transfección implica transcripción in vitro (IVT) de una plantilla con cebadores especialmente diseñados, seguido por adición de poli A, para producir un constructo que contiene la secuencia no traducida ('UTR') 3' y 5' (por ejemplo, una UTR 3' y/o 5' descrita en la presente), un cap 5' (por ejemplo, un cap 5' descrito en la presente) y/o un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) (por ejemplo, un IRES descrito en la presente), el

nucleico ácido a ser expresado, y una cola poli A, típicamente de 50-2000 bases de longitud. El ARN así producido puede transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En una realización, la plantilla incluye secuencias para el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares).

En una realización, un vector CAR de ARN o CAR de próxima generación se transduce en una célula, por ejemplo, una célula T o una célula NK, mediante electroporación. En otra realización, un vector CAR de ARN o CAR de próxima generación se transduce en una célula, por ejemplo, una célula T o una célula NK, provocando perturbaciones transitorias en la membrana celular utilizando un dispositivo de microfluidos como se describe en la solicitud de patente WO 2013/059343 A1 (PCT / US2012 / 060646). Las secuencias de polinucleótidos que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener usando métodos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, seleccionando bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o aislándolo directamente de células y tejidos que contienen el mismo, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el gen de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

La divulgación también proporciona vectores en los que se inserta un ADN que codifica los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la 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 a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja añadida sobre los vectores derivados de onco-retrovirus como los virus de la leucemia murina en que pueden transducir células no proliferantes, como los hepatocitos. Se proporcionan ejemplos de vectores lentivirales en las SEQ ID NO: 129-130 y 12639. Un vector retrovírico 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 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). Los vectores gammaretrovirales ejemplares incluyen el virus de la leucemia murina (MLV), el virus formador del foco del bazo (SFFV) y el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), y los vectores derivados de los mismos. En otra realización, el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el CAR deseado (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación es un vector adenoviral (A5 / 35).

La expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) se logra típicamente uniéndolos operativamente a un ácido nucleico que codifica CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) polipéptido o partes del mismo a un promotor, e incorporando la construcción en un vector de expresión. El vector lentivírico ejemplar que codifica CAR de la divulgación se proporciona en las SEQ ID NOs: 12640-41 y 14378, 14380-85. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación e integración en eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada. El vector puede contener un solo promotor o más de un promotor. En algunas realizaciones, las dos o más unidades funcionales de un CAR (por ejemplo, nucleótidos que codifican dos unidades polipeptídicas funcionales de un SIR o un zSIR o un Ab-TCR) están bajo el control de promotores separados. Las construcciones de expresión de la divulgación también se pueden usar para

la inmunización de ácidos nucleicos y la terapia génica, usando protocolos estándar de administración de genes. Los métodos para la administración de genes se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. NOs. 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466, incorporadas aquí como referencia en su totalidad.

5 Los métodos de clonación y expresión serán evidentes para un experto en la técnica.

Los métodos físicos para introducir polinucleótidos en células huésped tales como transfección con fosfato cálcico y similares son bien conocidos en la técnica y serán evidentes para un experto en la técnica. En otra realización, un vector CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) se transduce en una célula, por ejemplo, una célula T o una célula NK, provocando perturbaciones transitorias en membrana celular usando un dispositivo de microfluidos como se describe en la solicitud de patente WO 2013/059343 A1 (PCT / US2012 / 060646) y en Ding X et al., Nat. Biomed. Ing. 1, 0039 (2017), los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad como si se establecieran aquí.

En varias realizaciones, las células para modificaciones con CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) descritas en el presente documento, incluidas las células T o las células NK, pueden obtenerse de un sujeto deseando terapia. Las células T pueden obtenerse de diversas fuentes, incluidas células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, placenta, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. Las células T podrían ser células T gamma-delta residentes en tejido, que pueden cultivarse y expandirse in vitro antes de la expresión del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares).

En un aspecto, la divulgación proporciona una serie de CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que comprenden un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, TCR o fragmento de TCR) diseñado para la unión específica a un antígeno asociado a una enfermedad, por ejemplo, un antígeno tumoral descrito en este documento. En un aspecto, la divulgación proporciona una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, célula T, célula NKT) diseñada para expresar un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), en la que el La célula efectora inmunitaria diseñada presenta una propiedad terapéutica. En un aspecto, la divulgación proporciona una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, célula T, célula NKT) diseñada para expresar un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), en la que el la célula efectora inmunitaria diseñada por ingeniería genética presenta una propiedad anticancerígena. En una realización, una célula se transforma con el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab - TCR, TFP y similares) se expresa en la superficie celular. En algunas realizaciones, la célula (por ejemplo, célula T, célula NKT) se transduce con un vector viral que codifica un CAR (por ejemplo, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector retroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector lentivírico. En algunas de tales realizaciones, la célula puede expresar de forma estable el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). En otra realización, la célula (por ejemplo, Célula T, célula NKT) se transfecta con un ácido nucleico, por ejemplo, MRNA, cDNA, DNA, que codifica un CAR o CAR de próxima generación (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). En algunas de tales realizaciones, la

célula puede expresar transitoriamente el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares).

La descripción proporciona células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT o NK) que están diseñadas para contener uno o más CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que dirigen las células efectoras inmunes a células enfermas o células asociadas a enfermedades, como las células cancerosas. Esto se logra mediante un dominio de unión a antígeno en el CAR (por ejemplo, SIR, zSIR, Ab-TCR, Tri-Tac, TFP y similares) que es específico para un antígeno asociado al cáncer. Hay dos clases de antígenos asociados al cáncer (antígenos tumorales) que pueden ser dirigidos por los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, Tri-Tac, TFP y similares) de la divulgación: (1) antígenos asociados al cáncer que se expresan en la superficie de las células cancerosas; y (2) antígenos asociados al cáncer que en sí son intracelulares; sin embargo, un fragmento de dicho antígeno (péptido) se presenta en la superficie de las células cancerosas por el MHC (complejo principal de histocompatibilidad).

Además, la divulgación proporciona células que expresan CAR- (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y su uso en medicamentos o métodos para tratar, entre otras enfermedades, el cancer o cualquier malignidad o enfermedad autoinmune o enfermedad infecciosa o enfermedad degenerativa o enfermedad alérgica que involucre células o tejidos que expresan un antígeno tumoral o antígeno asociado a enfermedad como se describe en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación proporciona una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, célula T, NKT o célula NK) diseñada para expresar un CAR o CAR de próxima generación (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), en el que la célula efectora inmunitaria modificada presenta una propiedad anti-enfermedad, tal como propiedad antitumoral. En una realización, el antígeno es un antígeno asociado al cáncer (es decir, un antígeno tumoral) descrito en el presente documento. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) comprende un fragmento de anticuerpo parcialmente humanizado. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) comprende un scFv parcialmente humanizado. Por consiguiente, la divulgación proporciona CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que comprenden un dominio de unión a antígeno humanizado y está diseñado en una célula, por ejemplo, una célula T o una célula NK, y métodos para su uso para terapia adoptiva.

También se proporcionan en el presente documento células modificadas por ingeniería genética, que comprenden los polinucleótidos y / o el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula es un linfocito T (célula T). En alguna realización, la célula es una célula T ingenua, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora, una célula T reguladora (Treg) o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la célula es una célula asesina natural (NK), una célula madre hematopoyética (HSC), una célula madre embrionaria o una célula madre pluripotente. Las células modificadas genéticamente que pueden comprender y expresar los CAR de la divulgación incluyen, entre otros, linfocitos T (células T), células T vírgenes (TN), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria central (TCM), células de memoria efectora (TEM)), células asesinas naturales, células madre hematopoyéticas y / o células madre pluripotentes embrionarias / inducidas capaces de dar lugar

a una progenie terapéuticamente relevante. En una realización, las células modificadas por ingeniería genética son células autólogas. En una realización, las células modificadas por ingeniería genética son células alogénicas. A modo de ejemplo, las células T individuales de la divulgación pueden ser CD4 + / CD8-, CD4- / CD8 +, CD4- / CD8- o CD4 + / CD8 +. Las células T pueden ser una población mixta de células CD4 + / CD8- y CD4- / CD8 + o una población de un solo clon. Las células T CD4 + de la divulgación pueden producir IL-2, IFN, TNF y otras citocinas efectoras de células T cuando se cultivan conjuntamente in vitro con células que expresan los antígenos diana (por ejemplo, células tumorales CD20 + y / o CD19 +). Las células T CD8 + de la divulgación pueden lisar células diana específicas de antígeno cuando se cultivan conjuntamente in vitro con las células diana. En algunas realizaciones, las células T pueden ser una o más de las células vírgenes CD45RA + CD62L +, células de memoria central CD45RO + CD62L +, células de memoria efectoras CD62L o una combinación de las mismas (Berger et al. inmunidad celular, Curr Opin Immunol, 2009, 21 (2) 224-232). Las células genéticamente modificadas se pueden producir transfectando de forma estable células con ADN que codifica el CAR (por ejemplo, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación.

Las células modificadas por ingeniería genética pueden modificarse por ingeniería genética para anular la expresión de las cadenas de TCR endógenas, por ejemplo, cadenas de TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α . La desactivación de las cadenas endógenas de TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α se puede lograr usando una serie de técnicas conocidas en la técnica, tales como el uso de nucleasas de dedo CRISP / Cas9 y Zn. En una realización ejemplar, los ARNg que se dirigen a los loci de TCR α y TCR β pueden introducirse en células T o iPSC o células madre junto con ARNm de Cas9 para anular la expresión de las cadenas de TCR α y TCR β endógenas. Tales células deficientes en TCR α / β pueden usarse para introducir los CAR de la divulgación. La célula T que carece de un TCR endógeno funcional se puede diseñar de manera que no exprese ningún TCR endógeno funcional en su superficie, por ejemplo, se puede diseñar de tal manera que no exprese una o más subunidades (por ejemplo, cadenas constantes de TCR α , TCR β 1, TCR β 2, TCR γ endógenos). , TCR δ o pre-TCR α) que comprenden un TCR endógeno funcional o diseñado de manera que produce muy poco TCR endógeno funcional en su superficie. Alternativamente, la célula T puede expresar un TCR endógeno sustancialmente alterado, por ejemplo, mediante la expresión de formas mutadas o truncadas de una o más de las subunidades del TCR. El término "TCR sustancialmente alterado" significa que este TCR no provocará una reacción inmune adversa en un huésped. En una realización, la célula T alogénica o la célula NKT alogénica carece de expresión o tiene una expresión baja de un TCR funcional y / o un HLA funcional.

Varios métodos producen transfectantes estables que expresan los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación. En una realización, un método para transfectar y redirigir de manera estable células es mediante electroporación usando ADN desnudo. Mediante el uso de ADN desnudo, el tiempo necesario para producir células redirigidas puede reducirse significativamente. Los métodos adicionales para diseñar células genéticamente utilizando ADN desnudo que codifica el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, métodos de transformación química (por ejemplo, , usando fosfato de calcio, dendrímeros, liposomas y / o polímeros catiónicos), métodos de transformación no química (por ejemplo, electroporación, transformación óptica, electrotransferencia de genes,

perturbación transitoria en las membranas celulares y / o administración hidrodinámica) y / o métodos basados en partículas (por ejemplo, impalefección, usando una pistola de genes y / o magnetofección). Las células transfectadas que demuestran la presencia de un único vector integrado no reordenado y la expresión del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) pueden expandirse ex vivo. En una realización, las células seleccionadas para la expansión ex vivo son CD8 + y demuestran la capacidad de reconocer específicamente y lisar células diana específicas de antígeno.

También se pueden usar métodos de transducción viral para generar células redirigidas que expresan el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación. Los tipos de células que pueden usarse para generar células modificadas genéticamente que expresan el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación incluyen pero no se limitan a linfocitos T (T -células), células asesinas naturales, células madre hematopoyéticas y / o células madre embrionarias / inducidas pluripotentes capaces de dar lugar a una progenie terapéuticamente relevante.

La estimulación de las células T por un antígeno en condiciones adecuadas da como resultado la proliferación (expansión) de las células y / o la producción de IL-2. Las células que comprenden el CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la divulgación se expandirán en número en respuesta a la unión de uno o más antígenos a las regiones de direccionamiento específicas del antígeno del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). La divulgación también proporciona un método para fabricar y expandir células que expresan un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares). El método comprende transfectar o transducir las células con el vector que expresa CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y estimular las células con células que expresan los antígenos diana, antígenos diana recombinantes, o un anticuerpo contra el receptor para hacer que las células proliferen, para producir y expandir las células T. En una realización, las células pueden ser uno cualquiera o más de linfocitos T, células T asesinas naturales (NK), células madre hematopoyéticas (HSC) o células madre embrionarias / inducidas pluripotentes capaces de dar lugar a una progenie terapéuticamente relevante.

En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente descritas en este documento expresan las varias cadenas principales descritas en esto, en el que el componente CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) de la cadenas principales determina la especificidad del objetivo basada en el dominio específico del antígeno del CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares).

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**) que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o esqueleto-60, en el que el dominio específico de antígeno de los CAR es específico de una diana de antígeno en la **Tabla 3 y / o 7** y comprende las secuencias del dominio de unión a antígeno expuestas en la **Tabla 3 y / o 7**.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de MPL.

En una realización, las células modificadas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno El dominio específico de los CAR es específico de MPL.

5 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD19.

10 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de CD19.

15 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de CD19.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD20.

20 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de CD20.

25 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de BCMA.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de BCMA.

30 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD22.

35 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de CD22.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de BAFF-R.

40 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el

presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de BAFF-R.

5 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de Integrina B7.

10 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de Nectin 4.

15 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de Receptor de prolactina.

20 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de Muc17.

25 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD70.

30 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de CD70.

35 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de VISTA.

40 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de GPC3.

45 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de GPC3.

50 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de EMR2.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de EMR2.

5 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de gpNMB.

10 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de RNF43.

15 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de STEAP1.

20 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de Robo4.

25 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CLDN6.

30 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD44v6.

35 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de MMP16.

40 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de UPK1B.

45 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de BMPR1B.

50 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de Ly6E.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD79b.

5 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de CD79b.

10 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de WISP1.

15 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de Cripto.

20 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de gpA33.

25 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de IL1RAP.

30 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de BST1.

35 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de CD133.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD123.

40 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de CD123.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD138.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de CD138.

5 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CLL1.

10 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los CAR 1 a 15 que son parte de las cadenas principales descritas en el presente documento, como la cadena principal 1, la cadena principal 2, la cadena principal 32 o la cadena principal 60, en las que el antígeno-dominio específico del CAR es específico de CLL1.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de cadena constante TCR-beta1.

15 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de cadena constante TCR-beta2.

20 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de ALK.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de PTK7.

25 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de DLL3.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de TROP2.

30 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de Tim1.

35 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de LAMP1.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CS1.

40 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de Lym1.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de Lym2.

5 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de TSHR.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de NY-ESO/Complejo MHC clase I.

10 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de WT1/ Complejo MHC clase I.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de Ras/ Complejo MHC clase I.

15 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CD179a.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de CLD18A2.

20 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de epítipo CD43 expresado en células leucémicas.

En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de glicoproteína gp120 de la envoltura HIV1.

30 En una realización, las células manipuladas genéticamente comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican zSIR que son parte de los CAR 7-15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**), en donde los dominios específicos de antígeno son específicos de to región Fc de una inmunoglobulina.

En una modalidad, la célula efectora que expresa CAR descrita en la presente puede comprender además un segundo CAR que puede incluir un dominio de unión al antígeno diferente al mismo o diferente objetivo. En algunas modalidades, el segundo CAR puede dirigirse al mismo o diferente tipo de célula del primer CAR. En alguna realización, el segundo CAR puede ser de la misma clase (es decir, CAR 1 a CAR 15) que el primer CAR. En alguna forma de realización, el segundo CAR es de una clase diferente a la del primer CAR. En alguna realización, el segundo CAR tiene la misma estructura que el primer CAR. En alguna realización, el segundo CAR tiene una cadenas principales diferente a la del primer CAR.

35

40

En una realización, la célula efectora que expresa CAR (por ejemplo, un CAR 7-15) descrita en el presente documento puede comprender además un CAR de una clase diferente (por ejemplo, CAR 1 o CAR 2, etc.) con el mismo o diferente dominio de unión a antígeno, opcionalmente el mismo o un objetivo diferente. En algunas realizaciones, el segundo CAR (por ejemplo, un CAR 1, CAR 2, etc.) puede apuntar al mismo tipo de célula o a un tipo diferente del primer CAR (por ejemplo, un CAR 7-15).

En una realización, el CAR incluye un dominio de unión de antígeno a una diana expresada en el mismo tipo de célula de enfermedad (por ejemplo, cáncer) que el antígeno asociado a la enfermedad. En una realización, la célula que expresa CAR (por ejemplo, un CAR 7-15, por ejemplo, un zSIR) comprende un CAR que se dirige a un primer antígeno y un segundo receptor específico de antígeno (por ejemplo, un CAR) que se dirige a un segundo, diferente, antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que no tiene un dominio de señalización primario sino un dominio de señalización coestimulador. Si bien no desea ceñirse a la teoría, la colocación de un dominio de señalización coestimulador, por ejemplo, 4-1BB, CD28, CD27 u OX-40, en un receptor específico de antígeno, puede modular el CAR (por ejemplo, un CAR 7-15, por ejemplo, una actividad zSIR) en las células donde se expresan ambas dianas.

En una realización, la célula que expresa CAR (por ejemplo, una CAR 7-15, por ejemplo, una zSIR) comprende i) una primera CAR de antígeno asociado a la enfermedad que incluye uno o más dominios de unión a antígeno que se unen a un antígeno diana descrito en este documento, y ii) un CAR que se dirige a un antígeno diana diferente (por ejemplo, un antígeno expresado en el mismo tipo de célula asociada a la enfermedad (por ejemplo, cáncer) como el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario y un dominio coestimulador. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de un constructo ejemplar con esta configuración se presentan en SEQ ID NO: 14380 y SEQ ID NO: 16124, respectivamente. Los dominios de unión al antígeno del SIR en esta construcción están compuestos por los fragmentos vL y vH derivados del anticuerpo monoclonal BCMAAm06 que se dirige a BCMA, mientras que el dominio de unión al antígeno del CAR está compuesto por el dominio extracelular de PD1. El dominio de señalización primario del CAR en esta construcción comprende el dominio citosólico de CD3z, mientras que el dominio coestimulador comprende el dominio citosólico 4-1BB. En otra realización, la célula que expresa CAR (por ejemplo, un CAR 7-15, por ejemplo, un zSIR) comprende i) un primer CAR antígeno asociado a la enfermedad que incluye uno o más dominios de unión a antígeno que se unen a un antígeno diana descrito en este documento, y ii) un CAR que se dirige a un antígeno diana diferente (por ejemplo, un antígeno expresado en el mismo tipo de célula asociada a la enfermedad (por ejemplo, cáncer) que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio coestimulador pero sin una señalización primaria o dominio de activación. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de una construcción ejemplar con esta configuración se presentan en SEQ ID NO: 14379 y SEQ ID NO: 16123, respectivamente. Esta construcción es similar a la construcción mostrada en SEQ ID NO: 14380 con la excepción de que el CAR carece del dominio CD3z. En otra realización más, la célula que expresa CAR (por ejemplo, un CAR 7-15, por ejemplo, un zSIR) comprende i) un primer CAR antígeno asociado a la enfermedad que incluye uno o más dominios de unión a antígeno que se unen a un antígeno diana descrito en este documento, y ii) un CAR que se dirige a un antígeno diana diferente (por ejemplo, un antígeno expresado en el mismo tipo de célula asociada a la enfermedad (por ejemplo, cáncer) que el

primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario pero sin un dominio coestimulador. En otra realización más, la célula que expresa CAR (por ejemplo, un CAR 7-15, por ejemplo, un zSIR) comprende i) un primer CAR antígeno asociado a la enfermedad que incluye uno o más dominios de unión a antígeno que se unen a un antígeno diana descrito en este documento, y ii) un CAR que se dirige a un antígeno diana diferente (por ejemplo, un antígeno expresado en el mismo tipo de célula asociada a la enfermedad (por ejemplo, cáncer) que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario pero sin un dominio coestimulador.

Las células efectoras inmunes tales como las células T y las células NK que comprenden CAR como se describe en el presente documento pueden activarse y expandirse generalmente usando métodos como los descritos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 6.352.694; 6,534,055; 6.905.680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 20060121005.

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno asociado a la enfermedad o un antígeno asociado al cáncer.

En una realización, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar una enfermedad en un sujeto que lo necesita administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células modificadas genéticamente descritas en este documento (tales como células T, células NK) que están diseñadas para expresar un CAR específico de antígeno (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) solo o un CAR específico de antígeno (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y una molécula accesoria, en la que el antígeno es un antígeno específico de enfermedad como se describe en el presente documento, y en el que las células que causan la enfermedad o asociadas a la enfermedad expresan dicho antígeno específico de la enfermedad.

En una realización, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células modificadas genéticamente descritas en el presente documento (tales como células T, células NK) que se diseñan para expresar un CAR específico de antígeno (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Tri-Tac, Ab-TCR, TFP y similares) solo o un CAR específico de antígeno (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y una molécula accesoria, en la que el antígeno es un antígeno específico de cáncer como se describe en este documento, y en la que las células cancerosas expresan dicho antígeno tumoral.

En una realización, el antígeno específico del cáncer se expresa tanto en células normales como en células cancerosas, pero se expresa a niveles más bajos en células normales. En una realización, el método comprende además seleccionar un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que se une al antígeno específico del cáncer de interés con una afinidad que permite el CAR que es específico del antígeno para unirse y destruir las células cancerosas. En algunas realizaciones, el CAR específico de antígeno (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) mata las células cancerosas pero mata menos del 30%, 25%, 20%, 15%, %, 5% o menos de las células normales que expresan el antígeno canceroso. En realizaciones ejemplares, el porcentaje

de células muertas por los CAR específicos de antígeno puede determinarse usando los ensayos de muerte celular (por ejemplo, ensayo Matador) descritos en el presente documento.

En alguna realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las células modificadas genéticamente (por ejemplo, Células T, células NK) que se diseñan para expresar CAR convencionales. 1 a 15, donde el ASD de los CAR es específico del antígeno que se expresa en las células cancerosas (por ejemplo, el antígeno se expresa en niveles más bajos en las células normales en relación con las células cancerosas) y cuya SEC ID NO se enumera en la **Tabla 3**.

En alguna realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las células modificadas genéticamente (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para comprender la cadena principal-1 que comprende los CAR I convencionales y el módulo accesorio K13-vFLIP, en el que el ASD de los CAR es específico del antígeno que se expresa en las células cancerosas (por ejemplo, el antígeno se expresa en niveles más bajos en las células normales en relación con las células cancerosas) y cuya SEQ ID NO se enumera en la **Tabla 3**.

En alguna realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las células modificadas genéticamente (por ejemplo, Células T, células NK) que están diseñadas para comprender la cadena principal 12 que comprende los CAR II convencionales y el módulo accesorio HIV1-Vif, en el que el ASD de los CAR es específico del antígeno que se expresa en células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades (por ejemplo, el antígeno se expresa en niveles más bajos en células normales relativas a las células cancerosas).

En alguna realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las células modificadas genéticamente (por ejemplo, Células T, células NK) que se diseñan para que comprendan la cadena principal: 32 que comprende el CAR II convencional y el módulo accesorio K13-vFLIP, en el que el ASD de los CAR es específico del antígeno que se expresa en las células cancerosas (por ejemplo, el antígeno se expresa en niveles más bajos en las células normales en relación con las células cancerosas).

En realizaciones ejemplares, los antígenos que pueden ser dirigidos para los métodos terapéuticos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a uno, dos, tres, cuatro o más de: CD19; CD5, CD123; CD22; CD30; CD171; CS1 (también denominado subconjunto 1 de CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 y 19A24); Molécula 1 similar a lectina de tipo C (CLL-1 o CLECL1); BAFF-R; CD33; variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRviii); gangliósido G2 (GD2); gangliósido GD3 (aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDGlc (1-1) Cer); Maduración de células B de miembros de la familia del receptor de TNF (BCMA); Antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAc α -Ser / Thr)); antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA); Receptor receptor huérfano de tipo tirosina quinasa 1 (ROR1); Fms como tirosina quinasa 3 (FLT3); Glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72); CD38; CD44v6; un epítipo de CD43 glicosilado expresado en leucemia aguda o linfoma pero no en progenitores hematopoyéticos, un epítipo de CD43 glicosilado expresado en cánceres no hematopoyéticos, antígeno carcinoembrionario (CEA); Molécula de adhesión de células epiteliales

(EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); Subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2); Mesotelina; Receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre de próstata (PSCA); Proteasa Serina 21 (Testisin o PRSS21); receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); Antígeno de Lewis (Y); CD24; Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); Antígeno embrionario 4 específico de estadio (SSEA-4); CD20; Receptor de folato alfa (FRa o FR1); Receptor de folato beta (FRb); Receptor de tirosina-proteína quinasa ERBB2 (Her2 / neu); Mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión de células neurales (NCAM); Prostasa; fosfatasa de ácido prostático (PAP); factor de alargamiento 2 mutado (ELF2M); Efrina B2; proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP); receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (receptor de IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); Subunidad de proteasoma (prosome, macrodolor), tipo beta, 9 (LMP2); glicoproteína 100 (gp100); proteína de fusión de oncogén que consta de región de agrupamiento de punto de ruptura (BCR) y homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl); tirosinasa; receptor 2 de efrina tipo A (EphA2); molécula de adhesión de sialil Lewis (sLe); gangliósido GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDClalp (1-4) bDGlcp (1- 1) Cer); transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2); marcador endotelial tumoral 1 (TEM1 / CD248); relacionado con el marcador endotelial tumoral 7 (TEM7R); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR); Receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D); marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; quinasa del linfoma anaplásico (ALK); Ácido polisálico; 1 específico de placenta (PLAC1); porción de hexasacáridos de globoH glicoceramida (GloboH); antígeno de diferenciación de la glándula mamaria (NY-BR-1); uroplaquina 2 (UPK2); Receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); pannexina 3 (PANX3); Receptor 20 acoplado a proteína G (GPR20); complejo de antígeno de linfocitos 6, locus K 9 (LY6K); Receptor olfativo 51E2 (OR51E2); Proteína del marco de lectura alternativo de TCR gamma (TARP); Proteína del tumor de Wilms (WT1); Antígeno 1 de cáncer / testículo (NY-ES0-1); Antígeno 2 de cáncer / testículo (LAGE-1a); Antígeno asociado a melanoma 1 (MAGE-A1); Gen 6 de variante de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); proteína de esperma 17 (SPA17); Familia de antígenos X, miembro 1A (XAGE1); receptor 2 de la superficie celular de unión a angiopoyetina (Tie 2); antígeno 1 de testículo de cáncer de melanoma (MAD-CT-1); antígeno 2 de testículo de cáncer de melanoma (MAD-CT-2); Antígeno 1 relacionado con Fos; proteína tumoral p53 (p53); mutante p53; prostein; survivin; telomerasa; antígeno 1 del tumor del carcinoma de próstata (PCT A-1 o Galectina 8), antígeno de melanoma reconocido por las células T 1 (MelanA o MART1); Mutante de sarcoma de rata (Ras); transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT); puntos críticos de translocación de sarcoma; inhibidor de la apoptosis del melanoma (ML-IAP); ERG (proteasa transmembrana, gen de fusión de serina 2 (TMPRSS2) ETS); N-acetilglucosaminiltransferasa V (NA17); proteína de caja apareada Pax-3 (PAX3); Receptor de andrógenos; Cyclin B1; homólogo derivado de neuroblastoma de oncogén viral de mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN); Miembro de la familia Ras Homolog C (RhoC); Proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP-2); Citocromo P450 1B 1 (CYP1B 1); Factor de unión a CCCTC (proteína de dedo de zinc) similar (BORIS o hermano del regulador de sitios impresos), antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por células T 3 (SART3); Proteína de caja emparejada

Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1); proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK); Una proteína de anclaje de quinasa 4 (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto crítico 2 de X (SSX2); Receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE-1); ubicuo renal 1 (RU1); ubicuo renal 2 (RU2); legumain; virus del papiloma humano E6 (HPV E6); virus del papiloma humano E7 (HPV E7); carboxil esterasa intestinal; proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; Receptor 1 similar a inmunoglobulina asociado a leucocitos (LAIR1); Fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89); Miembro 2 de la subfamilia A del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos (LILRA2); Miembro f de la familia de tipo molécula CD300 (CD300LF); Miembro A de la familia 12 del dominio de lectina de tipo C (CLEC12A); antígeno 2 de células estromales de médula ósea (BST2); Receptor de hormona similar a mucina 2 (EMR2) que contiene un módulo similar a EGF; antígeno de linfocitos 75 (LY75); Glypican-3 (GPC3); De tipo receptor Fc 5 (FCRL5); y polipéptido de inmunoglobulina similar a lambda 1 (IGLL1), MPL, biotina, etiqueta de epítipo c-MYC, CD34, LAMP1 TROP2, GFRalpha4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, Slea (CA19.9; antígeno de Sialil Lewis); Fucosyl-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276 / B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGLI1, TCRgamma-delta, NKG2D, CD32 (FCGR2A), Tn ag, Tim1- / HVRA1 (GM-CSF) -alfa), TGFbetaR2, Lews Ag, cadena TCR-beta1, cadena TCR-beta2, cadena TCR-gamma, cadena TCR-delta, FITC, receptor de la hormona luteinizante (LHR), receptor de la hormona estimulante del folículo (FSHR), receptor de la hormona gonadotropina (CGHR o GR), CCR4, GD3, SLAMF6, SLAMF4, glicoproteína de la envoltura del VIH1, HTLV1-Impuesto, CMV pp65, EBV-EBNA3c, KSHV K8.1, KSHV-gH, hemaglutinina (HA) de influenza A, GAD, PDL1, Guanililo ciclasa C (GCC), autoanticuerpo contra desmogleína 3 (Dsg3), autoanticuerpo contra desmogleína 1 (Dsg1), HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IgE, CD99, Ras G12V, Factor tisular 1 (TF1), AFP, GPRC5D, Claudin18.2 (CLD18A2 o CLDN18A.2), CLDN6, P-glicoproteína, STEAP1, Liv1, Nectin-4, Cripto, MPL, gpA33, BST1 / CD157, canal de cloruro de baja conductancia y el antígeno reconocido por el anticuerpo TNT.

En algunas realizaciones, los dominios específicos de antígeno de los CAR comprenden secuencias scFv cuya SEC ID se establece en la **Tabla 3**.

En realizaciones ejemplares, los antígenos que pueden ser dirigidos para los métodos terapéuticos descritos en este documento incluyen, entre otros, uno, dos, tres, cuatro o más de los objetivos descritos en la **Tabla 3**.

La divulgación también proporciona un método que comprende la administración de una molécula de CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), una célula que expresa una molécula de CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) o una célula que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) a un sujeto. En una modalidad, el sujeto tiene un trastorno descrito en la presente, por ejemplo, el sujeto tiene cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad alérgica, enfermedad degenerativa o enfermedad autoinmune, que expresa un antígeno objetivo descrito en la presente. En todavía una modalidad, el sujeto tiene mayor riesgo de un trastorno descrito en la presente, por ejemplo, el sujeto tiene mayor riesgo de cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad alérgica, enfermedad degenerativa o enfermedad autoinmune, que expresa un antígeno objetivo

descrito en la presente. En una modalidad, el sujeto es un humano. En otra modalidad, el sujeto es un animal. En todavía otra modalidad, el sujeto es un animal de compañía tal como un perro.

La descripción proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno asociado a la enfermedad descrito en la presente.

5 En una modalidad, la descripción proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad proporcionando al sujeto en necesidad de los mismos, células efectoras inmunes (por ejemplo, células T) o células madre que pueden dar lugar a células efectoras inmunes que se han modificado para expresar un X-CAR dirigido, en donde X representa un antígeno asociado a la enfermedad como se describe en la presente, y en donde las células causantes de la enfermedad o
10 asociadas a la enfermedad expresan el antígeno X. La **Tabla 11** proporciona una lista de diferentes antígenos y las enfermedades ejemplares que se pueden prevenir, inhibir o tratar usando células efectoras inmunes que expresan CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) dirigidos a estos antígenos.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer, enfermedades
15 autoinmunes o alérgicas proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver , por ejemplo, **Tabla 1**) o esqueletos (por ejemplo, esqueleto-1, esqueleto-2, esqueleto-32 o esqueleto-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos para diferentes antígenos mostrados en la **Tabla 3** donde el ASD de CARs es compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NOs se enumeran en la **Tabla 3**.

20 En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunes o alérgicas proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver , por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de CD19, en los que las células que
25 causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan CD19 y en el que la ASD de CD19-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, neoplasia maligna de células B, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células del manto o mieloma múltiple. En una realización, la enfermedad a tratar es una enfermedad inmune (por ejemplo,
30 lupus, LES, PTI, etc.) o alergia.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunes o alérgicas proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver , por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de CD20, en los que las células que
35 causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan CD20 y en el que la ASD de CD20-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, neoplasia maligna de células B, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes o linfoma de células del manto. En
40 una realización, la enfermedad a tratar es una enfermedad inmune (por ejemplo, lupus, LES, PTI, etc.) o alergia.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunes o alérgicas proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver , por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicas de CD22, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan CD22 y en el que la ASD de CD22-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, neoplasia maligna de células B, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes o linfoma de células del manto. En una realización, la enfermedad a tratar es una enfermedad inmune (por ejemplo, lupus, LES, PTI, etc.) o alergia.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunes o alérgicas proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver , por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de BCMA, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan BCMA y en el que la ASD de BCMA-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer o una enfermedad inmune o alérgica. En una realización, el cáncer que se va a tratar o prevenir es una neoplasia maligna de células plasmáticas o mieloma múltiple o linfoma de derrame primario o linfoma difuso de células grandes. En una realización, la enfermedad a tratar es una enfermedad inmune (por ejemplo, lupus, LES, PTI, etc.) o alergia.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunes o alérgicas proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver , por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de MPL, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan MPL y en el que la ASD de MPL-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásico.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunes o alérgicas proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver , por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de BAFF-R, en los que las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan BAFF-R y en el que la ASD de BAFF-R-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto, B linfoma celular y leucemia aguda. En una realización, el cáncer a tratar es leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto, linfoma de células B y leucemia aguda.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunes o alérgicas proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de IL13Ra2, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan IL13Ra2 y en el que el ASD de IL13Ra2-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es un tumor cerebral.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunes o alérgicas proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal -1, cadena principal -2, cadena principal -32 o cadena principal -60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicas de CD79b, en las que las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan CD79b y en el que el ASD de CD79b-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células del manto, síndrome mielodisplásico o mieloma múltiple. En una realización, la enfermedad a tratar es una enfermedad inmune (por ejemplo, lupus, LES, PTI, etc.) o alergia.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunes o alérgicas proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de Her2, en los que las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan Her2 y en el que el ASD de Her2-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es cáncer de mama o cáncer gástrico.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de mesotelina (MSLN), donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan MSLN y donde el ASD de MSLN-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer gastrointestinal o cáncer de ovario.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, la **Tabla 2**) específicos de TSHR, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan TSHR y donde el ASD de TSHR-CAR está compuesto por fragmentos vL y

vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es cáncer de tiroides o leucemia / linfoma de células T.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos para el receptor de prolactina (PRLR), en donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan PRLR y en el que la ASD de PRLR-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer que se va a tratar es cáncer de mama o carcinoma de células renales cromóforo.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos para el receptor de folato 1 (FOLR1), donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan FOLR1 y en el que la ASD de FOLR1-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, el cáncer a tratar es cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de endometrio u otros tumores sólidos.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, la **Tabla 2**) específicos de PTK7, donde las células que causan la enfermedad o asociadas a la enfermedad expresan PTK7 y donde PTK7-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es melanoma, cáncer de pulmón o cáncer de ovario.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de DLL3, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan DLL3 y donde el ASD de DLL3-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es melanoma, cáncer de pulmón o cáncer de ovario.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, la **Tabla 2**) específicos de EGFRviii, donde las células que causan la enfermedad o asociadas a la enfermedad expresan EGFRviii y en donde el ASD de EGFRviii -CAR está compuesto

por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de cerebro o cáncer de pulmón u otros tumores sólidos.

5 En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de PSMA, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan PSMA y donde el ASD de PSMA-CAR está compuesto por fragmentos vL y
10 vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer que se va a tratar o prevenir es el cáncer de próstata.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales
15 (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de UPK1B, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan UPK1B y donde el ASD de UPK1B-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de vejiga.

20 En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de WISP1, en donde las células que causan enfermedades o
25 asociadas a enfermedades expresan WISP1. En una realización, la ASD de WISP1-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es glioblastoma o cáncer de mama.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de MMP16, en donde las células que causan enfermedades o
30 asociadas a enfermedades expresan MMP16. En una realización, la ASD de MMP16-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es glioblastoma, melanoma, cáncer de pulmón microcítico o neuroblastoma.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células
40 NKT) que están diseñadas para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-

60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de BMPR1B, en donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan BMPR1B. En una realización, la ASD de BMPR1B-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es

5 cáncer de próstata, cáncer de mama o cáncer de ovario.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-

10 60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de SLC34A2, en donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan SLC34A2. En una realización, la ASD de SLC34A2-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer de endometrio.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de gpA33, donde las células que causan enfermedades o asociadas

20 a enfermedades expresan gpA33 y donde el ASD de gpA33-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**.

En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer colorrectal, cáncer de ovario o cáncer de endometrio.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, la **Tabla 2**) específicos de BST1, donde las células que causan la enfermedad o asociadas a la enfermedad expresan BST1 y donde la BST1-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas

30 SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de sangre.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-

35 60) (ver, por ejemplo, la **Tabla 2**) específicos de CD133, donde las células que causan la enfermedad o asociadas a la enfermedad expresan CD133 y donde el ASD CD133-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de pulmón o

40 cáncer de cerebro.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de EMR2, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan EMR2 y donde el ASD de EMR2-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es leucemia aguda, linfoma, cáncer de mama y cáncer de colon.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de GPC3, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan GPC3 y donde el ASD de GPC3-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer que se va a tratar o prevenir es cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de pulmón.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, la **Tabla 2**) específicos de gpNMB, donde las células que causan la enfermedad o asociadas a la enfermedad expresan gpNMB y donde el ASD de gpNMB-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es melanoma, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de pulmón y otros tumores sólidos.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de IL1RAP, donde las células que causan la enfermedad o asociadas a la enfermedad expresan IL1RAP y donde el ASD de IL1RAP -CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer o endometriosis. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de hígado, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de ovario y otros tumores sólidos.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de Nectin-4, donde las células que causan enfermedades o

asociadas a enfermedades expresan Nectin-4 y en donde la ASD de Nectin-4-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer o endometriosis. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón y otros tumores sólidos.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de Cripto, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan Cripto y donde el ASD de Cripto-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio y otros tumores sólidos.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de RNF43, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan RNF43 y donde el ASD de RNF43-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de endometrio y otros tumores sólidos.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de ROR1, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan ROR1 y donde el ASD de ROR1-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer que se va a tratar o prevenir es cáncer de sangre, CLL y linfoma.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, la **Tabla 2**) específicos de FLT3, donde las células que causan enfermedades o asociadas a la enfermedad expresan FLT3 y donde el ASD de FLT3-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de sangre.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, la **Tabla 2**) específicos de CLL-1, en donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan CLL-1 y en el que el ASD de CLL-1-CAR está compuesto por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de sangre.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de Robo4, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan Robo4. En una realización, la ASD de Robo4-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de mama u otro tumor sólido.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de CLDN6, en donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan CLDN6. En una realización, la ASD de CLDN6-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer que se va a tratar o prevenir es cáncer de ovario, cáncer de hígado u otro tumor sólido.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de Muc5Ac, en donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan Muc5Ac. En una realización, la ASD de Muc5Ac-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de colon u otro tumor sólido.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de Muc17, en donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan Muc17. En una realización, la ASD de Muc17-CAR está

compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de colon u otro tumor sólido.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que están diseñadas para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de Ly6E, en los que las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan Ly6E. En una realización, la ASD de Ly6E-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer que se va a tratar o prevenir es cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de páncreas u otro tumor sólido.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar los CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de Integrina B7, en donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan Integrina B7. En una realización, la ASD de Integrina B7-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad que se va a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer que se va a tratar o prevenir es una neoplasia de células plasmáticas o un linfoma de derrame primario.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) que están diseñadas para expresar CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, La **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de STEAP1, en donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan STEAP1. En una realización, la ASD de STEAP1-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer gástrico, cáncer de próstata o linfoma.

En una realización, la divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer proporcionando al sujeto que lo necesita células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se diseñan para expresar CAR 1 a 15 (ver, por ejemplo, **Tabla 1**) o cadenas principales (por ejemplo, cadena principal-1, cadena principal-2, cadena principal-32 o cadena principal-60) (ver, por ejemplo, **Tabla 2**) específicos de Liv1, donde las células que causan enfermedades o asociadas a enfermedades expresan Liv1. En una realización, la ASD de Liv1-CAR está compuesta por fragmentos vL y vH cuyas SEQ ID NO se enumeran en la **Tabla 3**. En una realización, la enfermedad a tratar o prevenir es un cáncer. En una realización, el cáncer a tratar o prevenir es cáncer de mama, cáncer de próstata o tumor sólido.

Los cánceres ejemplares cuyo crecimiento puede inhibirse incluyen cánceres que responden típicamente a la inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, Melanoma maligno metastásico), cáncer renal (por ejemplo, Carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, Adenocarcinoma de próstata resistente a hormonas), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón (por ejemplo cáncer de pulmón de células no-pequeñas). Además, las neoplasias malignas refractarias o recurrentes pueden tratarse usando las moléculas descritas en el presente documento. Finalmente, las enfermedades no malignas, como la endometriosis, se pueden tratar usando los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) descritos en el presente documento.

En realizaciones ejemplares, los cánceres tratados mediante los métodos descritos en este documento incluyen tumores sólidos como sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas, de los diversos sistemas de órganos, como los que afectan al hígado, pulmón, mama, linfoide, gastrointestinal (por ejemplo, Colon) , tracto genitourinario (por ejemplo, células renales, uroteliales), próstata y faringe. Los adenocarcinomas incluyen tumores malignos como la mayoría de los cánceres de colon, cáncer de recto, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago. En una realización, el cáncer es un melanoma, por ejemplo, un melanoma en estadio avanzado. Las lesiones metastásicas de los cánceres antes mencionados también se pueden tratar o prevenir usando los métodos y composiciones de la divulgación.

Los ejemplos de otros cánceres que se pueden tratar incluyen cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemias crónicas o agudas, incluida la leucemia mieloide aguda , leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uréter, carcinoma de riñón al pelvis, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma de tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medio los inducidos por el amianto y combinaciones de dichos cánceres. El tratamiento de cánceres metastásicos, por ejemplo, cánceres metastásicos que expresan PD-L1 (Iwai y col. (2005) Int. Immunol. 17: 133-144) se puede realizar usando las moléculas CAR descritas en el presente documento. Además, la expresión de una enfermedad asociada con un antígeno asociado al cáncer como se describe en este documento incluye, pero no se limita a, por ejemplo, cánceres atípicos y / o no clásicos, neoplasias, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de un antígeno asociado al cáncer como se describe en el presente documento. Finalmente, las enfermedades no malignas, como la endometriosis, pueden tratarse usando los CAR descritos en este documento. En algunas realizaciones, una célula T que expresa CAR o una célula NKT como se

describe en este documento reduce la cantidad, número, cantidad o porcentaje de células y / o células cancerosas en al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos 50%, al menos 65%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 95% o al menos 99% en un sujeto con cáncer hematológico u otro cáncer asociado con un antígeno asociado al cáncer como se describe en este documento, que expresan células relativas a un control negativo. En una realización, el sujeto es un ser humano.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para inhibir el crecimiento de una enfermedad (por ejemplo, cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad infecciosa o alérgica o una enfermedad degenerativa), que comprende poner en contacto la célula causante de la enfermedad o asociada a la enfermedad con una célula genéticamente celda modificada de la divulgación que expresa un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) o un CAR con módulos accesorios (es decir, cadenas principales 1-60; ver Tabla 2) tal que el CAR-T se activa en respuesta al antígeno y se dirige a la célula que causa la enfermedad o asociada a la enfermedad, en donde se inhibe el crecimiento de la célula que causa la enfermedad o asociada a la enfermedad. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir una enfermedad, que comprende administrar a un paciente con riesgo de enfermedad un CAR- o CAR- de próxima generación (por ejemplo, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) que expresan células o una célula que es capaz de generar una célula que expresa CAR de la divulgación de manera que el CAR-T se activa en respuesta al antígeno y se dirige a la célula que causa la enfermedad o asociada a la enfermedad, donde el crecimiento de la célula que causa la enfermedad o asociada a la enfermedad se previene. En un aspecto, la enfermedad es un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inmunitaria, una enfermedad alérgica o una enfermedad degenerativa.

En un aspecto, la enfermedad es una enfermedad autoinmune. En una realización, la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno (AIED), síndrome linfoproliferativo (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmune (ATP), enfermedad de Behcet, miocardiopatía, esprúe-dermatitis hepática; síndrome de disfunción inmunológica por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), penfigoide cicatricial, enfermedad por crioaglutininas, síndrome de cresta, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis. Enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, trombocitopenia u ura idiopática (Γ P), nefropatía IgA, diabetes mellitus insulino dependiente, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Meniere, mixta enfermedad del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia gravis, anemia perniziosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, síndrome febril de Raynaud, fenómeno reumático artritis, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (PSS), también conocida como esclerosis sistémica (SS), síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico (LES), arteritis de Takayasu, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitiligo, granulomatosis de Wegener y cualquier combinación de los mismos.

Las realizaciones de la divulgación incluyen un tipo de terapia celular en la que las células efectoras (como las células T y las células NK) o las células madre que pueden dar lugar a células efectoras se modifican genéticamente para expresar un CAR como se describe en este documento y la célula T o la célula NKT que expresa el CAR o el CAR de próxima generación (por ejemplo, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de destruir las células tumorales del receptor. En varios aspectos, las células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) administradas al paciente, o su progenie, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años o cinco años después de la administración de la célula T o la célula NK al paciente.

La divulgación también incluye un tipo de terapia celular en la que las células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NK) se modifican, por ejemplo, Mediante ARN transcrito in vitro, para expresar transitoriamente un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) o un CAR con módulos accesorios (por ejemplo, backbones 1-60). Se infunden células T o células NKT a un receptor que lo necesite. Las células infundidas pueden destruir las células asociadas a la enfermedad (por ejemplo, células tumorales o células infectadas por virus) en el receptor. Por tanto, en varios aspectos, las células efectoras inmunitarias que expresan CAR o CAR de próxima generación (por ejemplo, Células T, células NKT) persisten durante menos de un mes, por ejemplo, Durante tres semanas, dos semanas o una semana, después de la administración de la Célula T o NK al paciente.

La divulgación también incluye un tipo de terapia celular donde las células madre (por ejemplo, Células madre hematopoyéticas o células madre linfoides o células madre embrionarias, o células madre pluripotentes inducidas) que son capaces de dar lugar a células efectoras inmunes (por ejemplo, T células o células NK) se modifican para expresar un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) o un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab -TCR, TFP y similares) con módulos accesorios (por ejemplo, cadenas principales 1-60; ver Tabla 2) y se administran a un receptor que lo necesita. Las células madre administradas dan lugar a células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T o células NKT) después del trasplante en el receptor, que (es decir, las células efectoras inmunitarias) son capaces de matar las células asociadas a la enfermedad en el receptor. Por lo tanto, en varios aspectos, las células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT) que se producen en el paciente después de la administración de CAR o de células madre que expresan CAR de próxima generación persisten durante al menos una semana, 2 semanas, 3 semanas, un mes, dos meses, tres meses, 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, cinco años, diez años o veinte años después de la administración de las células madre modificadas genéticamente al paciente. La divulgación también incluye un tipo de terapia celular en la que las células madre que son capaces de dar lugar a células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T o células NKT) se modifican para expresar un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) o un CAR con módulos

accesorios (por ejemplo, cadenas principales 1-60; ver Tabla 2) y se diferencian in vitro para generar células efectoras inmunes que se infunden en un receptor que las necesita. Las células efectoras inmunes infundidas (por ejemplo, células T o células NKT) después de la infusión en el receptor son capaces de destruir las células asociadas a la enfermedad en el receptor. Así, en varios aspectos, las células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NK) que se administran al paciente persisten en el paciente durante al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, una semana, 2 semanas, 3 semanas, un mes, dos meses, tres meses, 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, cinco años, diez años o veinte años .

La divulgación también incluye un tipo de terapia celular en la que las células efectoras inmunitarias reguladoras (por ejemplo, TREG o células T CD25 +) se modifican para expresar un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) o un CAR con módulos accesorios (por ejemplo, Cadenas principales 1-60) que se dirigen a un antígeno específico. Tales CAR-TREG se administran a un paciente para suprimir la respuesta inmune contra el antígeno específico. El CAR-TREG se puede utilizar para prevenir y tratar enfermedades autoinmunes y para mejorar la tolerancia inmunológica.

La respuesta de inmunidad antitumoral provocada por las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR o con CAR de próxima generación (por ejemplo, células T, células NKT) puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva, o alternativamente puede deberse a una vs respuesta inmune indirecta. En un aspecto, las células efectoras inmunitarias transducidas con CAR o con CAR de próxima generación (por ejemplo, Células T, células NK) exhiben secreción de citocinas proinflamatorias específicas y una potente actividad citolítica en respuesta a células humanas enfermas (por ejemplo, Células cancerosas o infectadas) expresar el antígeno asociado a la enfermedad como se describe en este documento, resistir el antígeno asociado a la enfermedad soluble como se describe en el presente documento, mediar en la muerte del espectador y mediar en la regresión de una enfermedad humana establecida, incluido el cáncer.

La divulgación también incluye un tipo de terapia celular donde las células efectoras inmunes (por ejemplo, células T y células NKT) o células madre que son capaces de dar lugar a células efectoras inmunes (por ejemplo, células T o células NK) se modifican para expresar un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) o un CAR con módulos accesorios (por ejemplo, cadenas principales 1-60) y se utilizan ex vivo para purgar la médula ósea o células madre hematopoyéticas de sangre periférica de células asociadas a enfermedades (por ejemplo, células cancerosas). Como ejemplo, las células T que expresan un CAR específico de CD19 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) se cocultivan con una muestra de médula ósea o de células madre de sangre periférica tomada de un paciente con leucemia linfocítica aguda o linfoma no Hodgkin para eliminar cualquier leucemia o células de linfoma presentes en la médula ósea o en la preparación de células madre de sangre periférica. Después de una duración adecuada de cultivo in vitro (ex vivo), que puede oscilar entre 6 horas y varios días, la muestra de médula ósea purgada y sangre periférica se usa para el autotrasplante en el paciente.

La expansión ex vivo de células madre y progenitoras hematopoyéticas se ha descrito en la patente de EE.UU. Nº 5.199.942, y se incorpora aquí como referencia, y puede aplicarse a las celdas de la divulgación. Sin embargo, la divulgación no se limita a ningún método particular de expansión ex vivo de las células y se pueden utilizar otros métodos adecuados conocidos en la técnica. Brevemente, el cultivo ex vivo y la expansión de células madre hematopoyéticas comprenden: (1) recolectar células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34 + de un mamífero a partir de muestras de sangre periférica o explantes de médula ósea; y (2) expandir tales células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la patente de EE.UU. 5.199.942, se pueden usar otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, para cultivar y expandir las células.

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

En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente con CAR completamente humanas o con CAR de próxima generación (tales como células T, células NKT) de la divulgación pueden ser un tipo de vacuna para inmunización ex vivo y / o terapia in vivo en un mamífero (por ejemplo, humano). Con respecto a la inmunización ex vivo, al menos uno de los siguientes ocurre in vitro antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR en las células o iii) criopreservación del células. Los procedimientos ex vivo son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.199.942, incorporada aquí como referencia.

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

En el presente documento se describen además métodos para controlar la actividad de las células CAR-T cuando se administran a los pacientes. En alguna realización, estos métodos se pueden usar para controlar los efectos secundarios de las células CAR-T, como el síndrome de liberación de citocinas, el síndrome de extravasación capilar y las complicaciones neurológicas. En alguna realización, el método implica la administración de inhibidores de tirosina quinasas, particularmente quinasas de la familia Scr, y en particular quinasas Lck. En una realización, el método implica la administración de Dasatinib, un inhibidor oral de moléculas pequeñas de las tirosina quinasas de la familia Abl y Src (SFK), que incluye p56Lck (Lck) (Lee KC et al, Leukemia (2010) 24, 896-900). En una realización, el inhibidor de la cinasa Src se administra al paciente después de la administración de células que expresan CAR para controlar o terminar la actividad de las células que expresan CAR. En una realización, se administra un inhibidor de Lck al paciente después de la administración de células que expresan CAR para controlar o terminar la actividad de las células que expresan CAR. En una realización, el inhibidor de Lck es A-770041.

En una realización, Dasatinib se administra al paciente después de la administración de células que expresan CAR para controlar o terminar la actividad de las células que expresan CAR. En una realización, dasatinib se administra por vía oral a una dosis de al menos 10 mg / día, 20 mg / día, 40 mg / día, 60 mg / día, 70 mg / día, 90 mg / día, 100 mg / día, 140 mg / día, 180 mg. / día, 210 mg / día, 250 mg / día o 280 mg / día.

En una realización, el ponatinib se administra al paciente después de la administración de células que expresan CAR para controlar o terminar la actividad de las células que expresan CAR. En una realización, el ponatinib se administra por vía oral a una dosis de al menos 15 mg / día, 30 mg / día, 45 mg / día, 60 mg / día.

5 Los linfocitos T tienen una duración de vida replicativa limitada hasta que alcanzan el estado de diferenciación terminal y luego entran en una fase de senescencia replicativa debido a la pérdida progresiva de telómeros con la edad. Los linfocitos T humanos muestran una vida útil limitada de aproximadamente 30 a 50 duplicaciones de población cuando se cultivan in vitro.

También se contemplan en este documento métodos para promover la supervivencia y
10 proliferación de células mononucleares de sangre periférica y células T y prevenir su senescencia replicativa para extender la vida útil de las células inmunes (por ejemplo, linfocitos y células NK) con el propósito de terapia celular adoptiva. El método implica la expresión ectópica de proteínas virales y / o celulares que promueven la supervivencia y la proliferación y bloquean la muerte celular inducida por activación. Una proteína ejemplar adecuada para este propósito incluye la proteína inhibidora viral
15 FLICE (vFLIP) K13 codificada por el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (también conocido como virus del herpes humano 8). En algunas realizaciones, las proteínas virales y celulares anteriores se expresan en las células inmunes (por ejemplo, células T y células NK) en su estado nativo o portan pequeñas etiquetas de epítipo y son funcionalmente activas de manera constitutiva. En otras realizaciones, las proteínas virales y celulares anteriores se expresan en las células inmunes (por
20 ejemplo, células T y células NK) en fusión con una o más copias de un dominio de cambio (o un dominio de dimerización), como FKBP y FKBPx2. En otra realización, el dominio FKBP o FKBP-x2 puede llevar adicionalmente una secuencia de mirisotilación N-terminal (Myr) para anclar las proteínas de fusión a la membrana celular. Las proteínas de fusión que llevan los dominios de cambio son funcionalmente inactivas en su estado basal pero se activan tras la adición de un agente dimerizador, tal como AP20187
25 como se describe en PCT / US2017 / 024843, que se incorpora como referencia en su totalidad en este documento.

También se contemplan en el presente documento métodos para promover la transducción y / o expresión mediada por lentivirales de un gen y / o ADNc extraño. El método implica la expresión de la proteína HIV1-Vif. En alguna realización, la proteína Vif está codificada en el mismo vector que el
30 gen extraño y / o el ADNc. En alguna realización, la proteína Vif está codificada en un vector diferente como gen extraño / ADNc. El gen / ADNc extraño ejemplar cuya transferencia y / o expresión puede potenciarse mediante la coexpresión de la proteína Vif del VIH1 incluyen CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR), TCR recombinante, globina y adenosina desaminasa, etc. En alguna realización, la coexpresión de la proteína Vif del VIH1 puede usarse para promover la transducción y /
35 o expresión mediada por lentivirales de cualquier gen / ADNc codificado o fragmento de ácido nucleico. En alguna realización, la proteína Vif del VIH1 está codificada en el mismo vector que el gen / ADNc de interés. En la SEC ID NO: 11268 se presenta un vector ejemplar que codifica un CAR y coexpresa la proteína Vif del VIH1. En las SEC ID N° 11244-11267 se presentan casetes de ácido nucleico ejemplares que codifican CAR y Vif del VIH. En alguna realización, la proteína Vif del VIH1 está
40 codificada en un vector diferente como el gen / ADNc de interés. La proteína Vif del VIH1 puede usarse para mejorar la transferencia / expresión génica en cualquier célula de mamífero. En algunas

realizaciones, la proteína Vif del VIH1 se usa para mejorar la transferencia / expresión génica en células mononucleares de sangre periférica, células T, células NK, células NKT, células B, células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes inducidas, células hepáticas, células cerebrales o células piels.

5 En una realización, una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T, expresa ectópicamente una o más de una proteína de señalización viral o celular seleccionada del grupo de K13-vFLIP (SEQ ID NO: 4107), MC159 (SEQ ID NO: 4108), cFLIP-L / MRIT-alfa (SEQ ID NO: 4109), cFLIP-p22 (SEQ ID NO: 4110), HIV1-Vif (SEQ ID NO: 4117), HTLV1-TAX (SEQ ID NO: 4113), HTLV2-TAX (SEQ ID NO: 4114), HTLV2-TAX-RS (SEQ ID NO: 4115) o una proteína con 70-99% de identidad
10 con las secuencias de aminoácidos de las proteínas anteriores.

En una realización, una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T, expresa ectópicamente una proteína de fusión que contiene uno o más dominios de cambio, por ejemplo, FKBP, FKBPx2 o Myr-FKBP, y una o más proteínas de señalización viral o celular seleccionadas del grupo K13-vFLIP (SEQ ID NO: 4107), MC159 (SEQ ID NO: 4108), cFLIP-L / MRIT-alfa (SEQ ID NO: 4109),
15 cFLIP-p22 (SEQ ID NO: 4110), HIV1 -Vif (SEQ ID NO: 4117), HTLV1-TAX (SEQ ID NO: 4113), HTLV2-TAX (SEQ ID NO: 4114), HTLV2-TAX-RS (SEQ ID NO: 4115).

En algunos aspectos, esta divulgación proporciona un método para producir una célula efectora inmunitaria adecuada para la terapia celular adoptiva, que comprende poner en contacto la célula con un ácido nucleico que codifica parcial o completamente una o más de una proteína de
20 señalización viral o celular seleccionada del grupo de K13-vFLIP (SEQ ID NO: 4107), MC159 (SEQ ID NO: 4108), cFLIP-L / MRIT-alpha (SEQ ID NO: 4109), cFLIP-p22 (SEQ ID NO: 4110), HIV1-Vif (SEQ ID NO: 4117), HTLV1-TAX (SEQ ID NO: 4113), HTLV2-TAX (SEQ ID NO: 4114), HTLV2-TAX-RS (SEQ ID NO: 4115) o proteínas con 70-99% de identidad a las secuencias de aminoácidos de las proteínas anteriores.

En algunos aspectos, esta divulgación proporciona un método para producir una célula efectora inmunitaria adecuada para la terapia celular adoptiva, que comprende poner en contacto la célula con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que contiene uno o más dominios de cambio, por ejemplo, FKBP, FKBPx2 o Myr. -FKBP, y una o más proteínas de señalización viral o celular
25 se seleccionan del grupo de K13-vFLIP (SEQ ID NO: 4107), MC159 (SEQ ID NO: 4108), cFLIP-L / MRIT-alfa (SEQ ID NO: 4109), cFLIP-p22 (SEQ ID NO: 4110), HIV1-Vif (SEQ ID NO: 4117), HTLV1-TAX (SEQ ID NO: 4113), HTLV2-TAX (SEQ ID NO: 4114), HTLV2-TAX -RS (SEQ ID NO: 4115) o
30 proteínas con 70-99% de identidad con las secuencias de aminoácidos de las proteínas anteriores.

En una realización, la célula adecuada para la terapia celular adoptiva expresa un receptor inmune natural o sintético. Ejemplos de tales receptores inmunes incluyen un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor de células T (TCR), un receptor de células T quimérico (cTCR), un
35 receptor de células T sintético, una proteína de fusión de TCR (TFP), un Ab-TCR y un receptor de muesca sintético. En una realización, la célula puede ponerse en contacto con el ácido nucleico que codifica las proteínas de señalización viral y celular antes, simultáneamente o después de entrar en contacto con una construcción que codifica un receptor inmune natural o sintético. En una realización,
40 la célula puede ponerse en contacto con el ácido nucleico que codifica las proteínas de señalización

viral y celular que contienen un dominio de cambio o dimerización antes, simultáneamente o después de ponerse en contacto con una construcción que codifica un receptor inmune natural o sintético.

En un aspecto, la divulgación presenta un método para preparar una población de células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NK). En una realización, el método comprende:

5 proporcionar una población de células efectoras inmunes (por ejemplo, células T o células NK), poner en contacto la población de células efectoras inmunes con un ácido nucleico que codifica un receptor inmunitario (por ejemplo, CAR, TCR, TCR sintético) y poner en contacto la población de células efectoras inmunes con un ácido nucleico que codifica una proteína de señalización viral o celular, en condiciones que permitan la coexpresión del receptor inmunitario y la proteína de señalización viral o

10 celular.

En una realización, el ácido nucleico que codifica la proteína de señalización viral o celular es ADN. En una realización, el ácido nucleico que codifica la proteína de señalización viral o celular contiene un promotor capaz de dirigir la expresión de las proteínas de señalización viral y celular. En una realización, el ácido nucleico que codifica la proteína de señalización viral o celular y el ácido

15 nucleico que codifica el receptor inmune se expresan a partir del mismo vector. En una realización, el ácido nucleico que codifica la proteína de señalización viral o celular y el ácido nucleico que codifica el receptor inmune se expresan a partir de vectores separados. En una realización, el ácido nucleico que codifica la proteína de señalización viral o celular (subunidad 1) y el ácido nucleico que codifica el receptor inmune (subunidad 2) se expresan a partir del mismo fragmento polinucleotídico que contiene

20 un sitio de entrada ribosómico interno (IRES) que permite la traducción de la segunda subunidad. En una realización, el ácido nucleico que codifica la proteína de señalización viral o celular (subunidad 1) y el ácido nucleico que codifica el receptor inmune (subunidad 2) se expresan a partir de un único fragmento polinucleotídico que codifica y las diferentes subunidades se separan mediante un enlazador escindible.

En una realización, el ácido nucleico que codifica la proteína de señalización viral o celular es un ARN transcrito in vitro. En una realización, la proteína de señalización viral o celular (subunidad 1) y el receptor inmune (subunidad 2) se expresan a partir del mismo ARN que contiene un sitio de entrada ribosómico interno (IRES) que permite la traducción de la segunda subunidad. En una

25 realización, la proteína de señalización viral o celular (subunidad 1) y el receptor inmune (subunidad 2) se expresan a partir de un solo ARN y las diferentes subunidades se separan mediante conectores escindibles.

En una realización, el ácido nucleico que codifica la proteína de señalización celular es la copia genómica de dicha proteína que se activa mediante la activación de su promotor por medios genéticos o químicos.

Los métodos terapéuticos descritos en este documento comprenden el uso de composiciones que comprenden células modificadas genéticamente que comprenden ácidos nucleicos que codifican CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) descritos en el presente documento. En varias realizaciones, los métodos terapéuticos descritos en este documento se pueden combinar con terapias y agentes existentes. Las composiciones terapéuticas descritas en

35 este documento, que comprenden células modificadas genéticamente que comprenden ácidos nucleicos que codifican los CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares)

40

descritas en el presente documento, se administran al sujeto con al menos una terapia o agente terapéutico adicional conocido. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en este documento y la terapia o agentes terapéuticos adicionales se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento y la terapia o agentes terapéuticos adicionales se administran simultáneamente. El orden óptimo de administración de las composiciones descritas en este documento y las terapias existentes serán evidentes para un experto en la técnica, como un médico.

Una célula que expresa CAR o CAR de próxima generación descrita en el presente documento y el al menos un agente terapéutico adicional se pueden administrar simultáneamente, en la misma o en composiciones separadas, o secuencialmente. Para la administración secuencial, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se puede administrar primero, y el agente adicional se puede administrar en segundo lugar, o se puede invertir el orden de administración.

Pueden administrarse terapias de combinación al sujeto durante la duración de la enfermedad. La duración de la enfermedad incluye desde el diagnóstico hasta la conclusión del tratamiento, en el que el tratamiento da como resultado la reducción de los síntomas y / o la eliminación de los síntomas. En varias realizaciones, 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 aún sea detectable cuando se administra el segundo.

La terapia CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y / u otros agentes, procedimientos o modalidades terapéuticas se pueden administrar durante períodos de trastorno activo, o durante una período de remisión o enfermedad menos activa. La terapia CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) se puede administrar 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 (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) y el agente adicional (por ejemplo, segundo o tercer agente), o todos, pueden administrarse en una cantidad o dosis que sea mayor, menor o igual que la cantidad o dosis de cada agente usado individualmente, por ejemplo, como monoterapia. En determinadas realizaciones, la cantidad o dosis administrada de la terapia CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), el agente adicional (por ejemplo, Segundo o tercer agente), o todos, es menor (por ejemplo, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50%) que la cantidad o dosis de cada agente usado individualmente, por ejemplo, como monoterapia. En otras realizaciones, la cantidad o dosis de la terapia CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), el agente adicional (por ejemplo, Segundo o tercer agente), o todos, que da como resultado un efecto deseado (por ejemplo, tratamiento del cáncer) es menor (por ejemplo, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50% menor) que la cantidad o dosis de cada agente usado individualmente, por ejemplo, como monoterapia, necesaria para lograr el mismo efecto terapéutico.

Otros aspectos del método se refieren a la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una célula, por ejemplo, una célula efectora inmunitaria, o una población de la misma, comprendiendo cada célula un CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), opcionalmente en combinación con un agente que aumenta la eficacia y / o seguridad de la célula

inmunitaria. En aspectos adicionales, el agente que aumenta la eficacia y / o seguridad de la célula inmunitaria es uno o más de: (i) un inhibidor de proteína fosfatasa; (ii) un inhibidor de quinasa; (iii) una citocina; (iv) un inhibidor de una molécula inmunitaria inhibidora; o (v) un agente que reduce el nivel o la actividad de una célula TREG; vi) un agente que aumenta la proliferación y / o persistencia de células modificadas con CAR vii) una quimiocina viii) un agente que aumenta la expresión de CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares) ix) un agente que permite la regulación de la expresión o actividad de CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares), x) un agente que permite controlar la supervivencia y / o persistencia de células modificadas con CAR, xi) un agente que controla los efectos secundarios de las células modificadas con CAR, xii) un inhibidor de Brd4 xiii) un agente que administra un agente terapéutico (por ejemplo, SHVEM) o profiláctico en el sitio de la enfermedad, xiv) un agente que aumenta la expresión del antígeno diana contra el que se dirige CAR (por ejemplo, CAR I, CAR II, SIR, zSIR, Ab-TCR, TFP y similares); xv) un antagonista del receptor de adenosina A2a; xvi) un agente que agota los monocitos y / o macrófagos; xvii) Etopósido

En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente descritas en el presente documento pueden usarse en un régimen de tratamiento en combinación con cirugía, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas e irradiación, vacuna peptídica, como la descrita en Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108: 963-971. En una realización, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede usarse 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, descarbazina, melfalán, temofamida), un anticuerpo de células inmunes (por ejemplo, alemtuzamab, gemtuzumab, rituximab, ofatumumab, tositumomab, brentuximab), un antimetabolito (que incluye, por ejemplo, antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de la adenosina desaminasa (por ejemplo, fludarabina)), un inhibidor de mTOR, un agonista de la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides TNFR (GITR), un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, aclacinomicina A, gliotoxina o bortezomib), un inmunomodulador como la talidomida o un derivado de la talidomida (por ejemplo, lenalidomida).

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con ciclofosfamida y fludarabina.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto al que se le ha administrado previamente quimioterapia tanto mieloablativa como linfodeplectora. Los regímenes de acondicionamiento mieloablativo y linfodelector ejemplares incluyen FCE (fludarabina 25 mg / m² / día, días -7 a -3; ciclofosfamida 200 mg / m² / día, días -7 a -3; y etopósido 250 mg / m² / día, días -4 a -3), FCIE (fludarabina 25 mg / m² / día, días -7 a -3; ciclofosfamida 200 mg / m² / día, días -7 a -3; idarubicina 12 mg / m² / día, días -7 a -5 y etopósido 250 mg / m² / día, días -4 a -3), FluCyE (fludarabina 30 mg / m² / día, citarabina 1,5 g / m² / día administrados después de fludarabina y etopósido 100 mg / m² / día con cada uno de los los fármacos

administrados los días -6 a -1), o FE (fludarabina 30 mg / m² / día y Etopósido 100 mg / m² / día los días -5 a día -1). En algunas realizaciones, las células que expresan CAR se administran al sujeto entre 1 día y 5 días después de la última dosis de quimioterapia.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto al que se le ha administrado previamente etopósido. En algunas realizaciones, el etopósido se administra por vía intravenosa a una dosis de 50 mg / m² / día a 250 mg / m² / día durante 1-5 días. En algunas realizaciones, el etopósido se dosifica a 5 mg / kg por dosis entre 1 y 5 dosis. En algunas realizaciones, las células que expresan CAR se administran al sujeto entre 1 día y 5 días después de la última dosis de etopósido.

En realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con bendamustina y rituximab.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en este documento se administra a un sujeto en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y / o un corticosteroide (por ejemplo, prednisona). En realizaciones, un CAR o una célula que expresa CAR de próxima generación descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP). En realizaciones, el sujeto tiene linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

En algunas realizaciones, 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. En realizaciones, una célula que expresa CAR o CAR de próxima generación descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina y rituximab (EPOCH-R). En realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con EPOCH-R (DA-EPOCH-R) ajustada a la dosis. En realizaciones, el sujeto tiene un linfoma de células B, por ejemplo, un linfoma agresivo de células B con reordenamiento de Myc.

En algunas realizaciones, 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. En algunas realizaciones, el sujeto tiene linfoma de Hodgkin (HL), por ejemplo, HL recidivante o refractario. En algunas realizaciones, el sujeto comprende CD30 + HL. En realizaciones, el sujeto se ha sometido a un autotrasplante de células madre (ASCT).

En algunas realizaciones, 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 anti-CD20 mono o biespecífico) o un fragmento del mismo.

En una realización, 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 rapalog tal como everolimus. En una realización, el inhibidor de mTOR se administra antes de la administración de células que expresan CAR. Por ejemplo, en una realización, el inhibidor de mTOR puede administrarse antes de la aféresis de las células. En una realización, el sujeto tiene CLL.

En una realización, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede usarse en combinación con un inhibidor de quinasa. En una realización, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de CDK4, por ejemplo, un inhibidor de CDK4 descrito en el presente documento, por ejemplo, un inhibidor de CD4 / 6, como por ejemplo palbociclib o PD0332991. En una realización, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK, por ejemplo, un inhibidor de BTK descrito en este documento, tal como, por ejemplo, ibrutinib. En algunas realizaciones, ibrutinib se administra en una dosis de aproximadamente 300-600 mg / día (por ejemplo, aproximadamente 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550 o 550-600 mg / día, por ejemplo, aproximadamente 420 mg / día o aproximadamente 560 mg / día), por ejemplo, por vía oral. En las realizaciones, el ibrutinib se administra en 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) al día durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante un ciclo de 21 días, o diariamente durante un ciclo de 28 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de ibrutinib.

En una realización, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor de mTOR descrito en el presente documento, tal como, por ejemplo, rapamicina, un análogo de rapamicina, OSI-027. En una realización, el inhibidor de quinasa es una PI3K dual / Inhibidor de mTOR descrito en el presente documento, tal como, por ejemplo, PF-04695102.

En una realización, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de quinasa Src. En una realización, el inhibidor de quinasa es Dasatinib. En una realización, el inhibidor de la cinasa Src se administra al paciente después de la administración de células que expresan CAR para controlar o terminar la actividad de las células que expresan CAR. En una realización, Dasatinib se administra al paciente después de la administración de células que expresan CAR para controlar o terminar la actividad de las células que expresan CAR. En una realización, dasatinib se administra por vía oral a una dosis de al menos 10 mg / día, 20 mg / día, 40 mg / día, 60 mg / día, 70 mg / día, 90 mg / día, 100 mg / día, 140 mg / día, 180 mg / día o 210 mg / día.

En realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de quinasa de linfoma anaplásico (ALK).

Fármacos que inhiben la fosfatasa calcineurina dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina). (Liu y col., Cell 66: 807-815, 1991; Henderson y col., Immun. 73: 316-321, 1991; Bierer y col., Curr. Opin. Immun. 5: 763-773, 1993) puede también se utilizará. En un aspecto adicional, las composiciones de células de la divulgación pueden administrarse a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) de un trasplante de médula ósea, terapia ablativa de células T usando agentes de quimioterapia tales como fludarabina, radioterapia de haz externo. (XRT), ciclofosfamida y / o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. En un aspecto, las composiciones de células de la divulgación se administran después de la terapia ablativa de células B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de un trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertas realizaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunes expandidas de la divulgación. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

En realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un autotrasplante de células madre, un alotrasplante de células madre, un autotrasplante de médula ósea o un alotrasplante de médula ósea.

5 En realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con microtrasplante o terapia celular alogénica no emparejada con HLA (Guo M et al, J Clin Oncol. 20 de noviembre de 2012; 30 (33): 4084-90).

En realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de indolaamina 2,3-dioxigenasa (IDO).

10 En realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un modulador de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC).

En realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de Brd4 o BET (bromodominio y motivo extra-terminal). Los inhibidores de Brd4 ejemplares que se pueden administrar en combinación con células
15 que expresan CAR incluyen, pero no se limitan a, JQ1, MS417, OTXO15, LY 303511 e inhibidor de Brd4 como se describe en el documento US 20140256706 A1 y cualquier análogo de los mismos.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en este 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 tanto un polipéptido de IL-15 como un
20 polipéptido de IL-15Ra, por ejemplo, hetIL-15 (Admune Therapeutics, LLC). En algunas realizaciones, het-IL-15 se administra por vía subcutánea.

En una realización, al sujeto se le puede administrar un agente que reduce o mejora un efecto secundario asociado con la administración de una célula que expresa CAR. Los efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa CAR incluyen, pero no se
25 limitan a, CRS y linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), también denominado síndrome de activación de macrófagos (MAS).

Por consiguiente, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender administrar una célula que expresa CAR descrita en el presente documento a un sujeto y administrar además uno o más agentes para controlar niveles elevados de un factor soluble resultante del
30 tratamiento con una célula que expresa CAR. En una realización, el factor soluble elevado en el sujeto es uno o más de IFN- γ , TNFa, IL-2 e IL-6. En una realización, el factor elevado en el sujeto es uno o más de IL-1, GM-CSF, IL-10, IL-8, IL-5 y fraktalkine. Por tanto, un agente administrado para tratar este efecto secundario puede ser un agente que neutralice uno o más de estos factores solubles. En una realización, el agente que neutraliza una o más de estas formas solubles es un anticuerpo o fragmento
35 de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, un esteroide (por ejemplo, corticosteroide), inhibidores de Src (por ejemplo, Dasatinib), un inhibidor de TNFa y un inhibidor de IL-6. Un ejemplo de un inhibidor de TNFa es una molécula de anticuerpo anti-TNFa como infliximab, adalimumab, certolizumab pegol y golimumab. Otro ejemplo de un inhibidor de TNFa es una proteína de fusión como entanercept. Un ejemplo de un inhibidor de IL-6 es una molécula
40 de anticuerpo anti-IL-6 o una molécula de anticuerpo anti-receptor de IL-6 como tocilizumab (toe), sarilumab, elsilimomab, CNTO 328, ALD518 / BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30,

ARGX-109, FE301 y FM101. En una realización, la molécula de anticuerpo anti-receptor de IL-6 es tocilizumab. En una realización, el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo biespecífico de camélido que se une a IL6R y albúmina de suero humano (por ejemplo, IL6R-304-Alb8) (SEQ ID NO: 2649). Un ejemplo de un inhibidor basado en IL-1R es anakinra. En una realización, un agente administrado para tratar los efectos secundarios de las células que expresan CAR es un inhibidor de Src (por ejemplo, Dasatinib). En una realización, un agente administrado para tratar los efectos secundarios de las células que expresan CAR es el inhibidor de Src Dasatinib. En realizaciones, Dasatinib se administra a una dosis de aproximadamente 10 mg / día a 240 mg / día (por ejemplo, 10 mg / día, 20 mg / día, 40 mg / día, 50 mg / día, 70 mg / día, 80 mg / día, 100 mg / día, 110 mg / día, 120 mg / día, 140 mg / día, 180 mg / día, 210 mg / día, 240 mg / día o 300 mg / día).

En una realización, al sujeto se le puede administrar un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras, por ejemplo, Muerte Programada 1 (PD-1), pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR para montar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD-1, PDL1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y / o CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo, por inhibición a nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar el rendimiento de una célula que expresa CAR. En realizaciones, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, Un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, Un dsRNA, por ejemplo, Un siRNA o shRNA, una repetición palindrómica corta agrupada regularmente interespaciada (CRISPR), un activador de la transcripción como nucleasa efectora (TALEN), o se puede usar una endonucleasa con dedos de zinc (ZFN), por ejemplo, como se describe en el presente documento, para inhibir la expresión de una molécula inhibidora en la célula que expresa CAR. En una realización, el inhibidor es un ARNhc. En una realización, la molécula inhibidora se inhibe dentro de una célula que expresa CAR. En estas realizaciones, una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula inhibidora se une al ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes del CAR. En una realización, 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 un fragmento de anticuerpo que se une a PD-1, PD-L1, PD-L2 o CTLA4. En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a TIM3. En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 y / o CEACAM-5). En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a LAG3.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de PD-1, PD-L1 y PD-L2 están disponibles en la técnica y pueden usarse en combinación con un CAR de la divulgación descrita en el presente documento. El pembrolizumab es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD-1. En otras realizaciones, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR es un inhibidor de CEACAM (por ejemplo, un inhibidor de CEACAM-1, CEACAM-3 y / o CEACAM-5).

En una realización, el agente que potencia la actividad de un CAR descrito en el presente documento es otro agente que aumenta la expresión del antígeno diana contra el que se dirige el CAR. Los agentes que se pueden administrar al sujeto que recibe una célula que expresa CAR descritos en

este documento incluyen: trióxido de arsénico, ATRA (ácido todo-trans-retinoico), compuestos 27, 40, 49 de (Du et al, Blood; prepublicado en línea el 12 de octubre , 2016), inhibidores de IDH2 (por ejemplo, AG-221) o una combinación de los mismos. En una realización, los agentes se administran antes, al mismo tiempo o después de la administración de células que expresan CAR. En realizaciones preferidas, estos agentes se administran antes de la administración de células que expresan CAR. En una realización preferida, las células que expresan CAR que se administran con los agentes anteriores se dirigen a un antígeno de células B (por ejemplo, CD19, CD20 o CD22, etc.).

En una realización, el agente que mejora la actividad de un CAR o CAR de próxima generación descrito en el presente documento es un receptor soluble. El receptor soluble que se puede administrar al sujeto que recibe una célula que expresa CAR descrito en este documento incluye: sHVEM (SEQ ID NO: 2664), proteína de fusión sHVEM-Alb8-vHH (SEQ ID NO: 2665), o una combinación de los mismos. El receptor soluble se puede administrar 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. El receptor soluble se puede administrar durante más de un día, p. el receptor soluble se administra durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. Por ejemplo, el receptor soluble se administra una vez al día durante 7 días.

En una realización, al sujeto se le puede administrar un agente que protege contra la toxicidad de una célula que expresa CAR en tejidos normales. Una de las limitaciones de la terapia con células CAR-T podría ser la toxicidad en el tejido normal. Por ejemplo, CAR o CAR de próxima generación que se dirija a CD19 podría conducir a una disminución a largo plazo de las células B normales, que también expresan el antígeno CD19. En una realización, la terapia con células CD19 CAR-T se puede combinar con la desactivación o mutación de CD19 endógeno en células madre hematopoyéticas normales. En una realización, la desactivación o mutación del CD19 endógeno se logra usando CRIPS / Cas9, Talons u otros métodos de edición de genes adecuados que se conocen en la técnica. El epítipo de CD19 unido por las células CAR-T CD19 en el uso clínico actual se ha mapeado en el exón 2-4. En una realización, se generan mutaciones sin sentido o sin sentido en el exón 2 (u otros exones / regiones adecuados que son reconocidos por células T CAR dirigidas a CD19) de células madre hematopoyéticas autólogas o alogénicas usando CRISP / Cas9, nucleasas de dedo de Zn, Talons u otros métodos conocidos en la técnica. En una realización, al sujeto se le administra una infusión de células CD19 CAR-T para controlar su enfermedad y un trasplante de células madre autólogas o alogénicas usando células madre hematopoyéticas CD19 delecionadas / mutadas. Como las células B que se originarán a partir de las células madre modificadas no serán el objetivo de las células CD19-CAR-T, el paciente escapará de la aplasia de células B, que es un efecto secundario común de las células CD19-CAR-T. En otra realización, la terapia con células MPL CAR-T se combina con la eliminación o mutación de MPL endógena en células madre hematopoyéticas normales. En otra realización, la terapia con células CAR-T CD123 se combina con la desactivación o mutación de CD123 endógeno en células madre hematopoyéticas normales. En otra realización, la terapia con células CD33 CAR-T se combina con la desactivación o mutación de CD33 endógeno en células madre hematopoyéticas normales. En otra realización, la terapia con células CAR-T CD20 se combina con la desactivación o mutación de CD20 endógeno en células madre hematopoyéticas normales. En otra realización, la terapia con células CAR-T CD22 se combina con la desactivación o mutación de CD22

endógeno en células madre hematopoyéticas normales. En otra realización, la terapia con células CS1 CAR-T se combina con la desactivación o mutación de CS1 endógena en células madre hematopoyéticas normales. En otra realización, la terapia con células BCMA CAR-T se combina con desactivación o mutación de BCMA endógena en células madre hematopoyéticas normales. En otra

5 realización, la terapia con células CD45 CAR-T se combina con la desactivación o mutación de CD45 endógeno en células madre hematopoyéticas normales o células efectoras inmunes (por ejemplo, células T o células NK). Esencialmente, se podría usar un enfoque similar para mitigar la toxicidad de las células CAR-T contra el tejido normal donde el antígeno dirigido por el CAR o el CAR de próxima generación también se expresa en células madre hematopoyéticas normales o una de sus progenies.

10 En otra realización, la terapia con células CAR-T se combina con la eliminación o mutación de un gen o proteína endógena dirigida por el CAR o el CAR de próxima generación en la célula efectora inmunitaria (por ejemplo, Células T o células NK) o células madre que dan lugar a células efectoras inmunes. Por ejemplo, dado que CD45 se expresa en todas las células hematopoyéticas, las células CAR-T dirigidas a CD45 serían difíciles de generar, ya que serían eliminadas por las células CD45-

15 CART vecinas. Sin embargo, tales células pueden generarse si la expresión de CAR CD45 en células T se combina con la eliminación o eliminación de CD45 endógena en las células T en las que se expresa CAR CD45 o CAR de próxima generación. Esencialmente, se puede usar un enfoque similar para generar CAR o CAR de próxima generación que se dirija a otros antígenos que se expresan en células efectoras inmunes. Ejemplos de tales antígenos incluyen, pero no se limitan a, CD5, TCR α , TCR β 1, TCR β 2, TCR γ , TCR δ , preTCR α y varios receptores expresados en células NK.

20 Las citocinas que se pueden administrar al sujeto que recibe una célula que expresa CAR descritas en el presente documento incluyen: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-18, LIGHT e IL- 21, o una combinación de los mismos. En realizaciones preferidas, la citoquina administrada es IL-7, IL-15 o IL-21, IL12F o una combinación de los mismos. La citoquina se puede administrar una vez al día o más

25 de una vez al día, por ejemplo, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. La citoquina se puede administrar durante más de un día, p. la citocina se administra durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. Por ejemplo, la citocina se administra una vez al día durante 7 días. En una realización preferida, la citoquina administrada después de la administración de células que expresan CAR es IL-7.

30 En una realización, el agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR descrito en el presente documento es un inhibidor de Brd4 o un ARNip o un ARNhc dirigido a BRD4 como se describe en (Tolani, B et al., Oncogene, 29; 33 (22): 2928-37. PMID: 23792448) (Tolani, Gopalakrishnan, Punj, Matta y Chaudhary, 2014).

35 También se proporcionan en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los receptores de antígenos quiméricos, los polinucleótidos, los polipéptidos, los vectores, los virus y / o las células y / o compuestos químicos modificados genéticamente descritos en este documento y portador. Tales composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como

40 glicina; antioxidantes; agentes quelantes como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido

de aluminio); y conservantes. En un aspecto, las composiciones de la divulgación están formuladas para administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad que se va a tratar. La cantidad y frecuencia de administración vendrán determinadas por factores tales como el estado del paciente y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

Cuando se indica una "cantidad terapéuticamente eficaz", un médico puede determinar la cantidad precisa de las composiciones de la divulgación que se administrarán teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis, y estado del paciente (sujeto). En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células modificadas genéticamente (células T, células NK) descritas en este documento puede administrarse en una dosis de 10^4 a 10^9 células / kg de peso corporal, en algunos casos de 10^5 a 10^6 células / kg de peso corporal. , incluidos todos los valores enteros dentro de esos rangos. Las composiciones de células T también se pueden administrar múltiples veces a estas dosis. Las células se pueden administrar usando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988).

En algunas realizaciones, puede ser deseable administrar células modificadas genéticamente activadas (células T, células NK) a un sujeto y luego volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar las células modificadas genéticamente y reinfundir al paciente con estas células modificadas genéticamente activadas y expandidas. Este proceso se puede realizar varias veces cada pocas semanas. En ciertos aspectos, las células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NK) se pueden activar a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En ciertos aspectos, las células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NK) se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc o 100 cc.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

En diversas realizaciones, las composiciones farmacéuticas según la divulgación pueden formularse para su administración mediante cualquier vía de administración. "Vía de administración" puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, que incluye pero no se limita a aerosol, nasal, oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, inhalación, transmucosa, transdérmica, parenteral, bomba implantable, infusión continua, aplicación tópica, cápsulas y / o inyecciones.

Las composiciones farmacéuticas según la divulgación también pueden contener cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. "Vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que está involucrado en el transporte o transporte de un compuesto de interés de un tejido, órgano o porción del cuerpo a otro tejido, órgano o porción de el cuerpo. Por ejemplo, el vehículo puede ser una carga, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante líquido o sólido, o una combinación de los mismos. Cada componente del vehículo debe ser "farmacéuticamente aceptable" en el sentido de que

debe ser compatible con los demás ingredientes de la formulación. También debe ser apto para su uso en contacto con cualquier tejido u órgano con el que pueda entrar en contacto, por lo que no debe conllevar riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos. .

5 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la divulgación también pueden encapsularse, comprimirse o prepararse en una emulsión o jarabe para administración oral. Pueden añadirse vehículos sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para mejorar o estabilizar la composición o para facilitar la preparación de la composición. Los vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, glicerina, solución salina, alcoholes y agua. Los vehículos sólidos
10 incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio, dihidrato, terra alba, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, goma arábica, agar o gelatina. El vehículo también puede incluir un material de liberación sostenida tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.

15 Las preparaciones farmacéuticas se elaboran siguiendo las técnicas convencionales de farmacia que implican moler, mezclar, granular y comprimir, cuando sea necesario, para formas de comprimidos; o molienda, mezcla y llenado para formas de cápsulas de gelatina dura. Cuando se usa un vehículo líquido, la preparación estará en forma de jarabe, elixir, emulsión o suspensión acuosa o no acuosa. Tal formulación líquida se puede administrar directamente por vía oral o relleno en una cápsula de gelatina blanda.

20 Las composiciones farmacéuticas según la divulgación pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz precisa es aquella cantidad de la composición que producirá los resultados más eficaces en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto dado. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen, entre otros, las características del compuesto terapéutico (incluida la actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluida la edad, el sexo, el tipo de enfermedad y la etapa). , estado físico general, capacidad de respuesta a una dosis dada y tipo de medicación), la naturaleza del portador o portadores farmacéuticamente aceptables en la formulación y la vía de administración. Un experto en la técnica clínica y farmacológica podrá determinar una cantidad terapéuticamente eficaz mediante experimentación de rutina, por ejemplo, controlando la respuesta de
25 un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosis en consecuencia. Para obtener orientación adicional, consulte Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20ª edición, Williams & Wilkins PA, EE. UU.) (2000).

La administración de las composiciones objeto se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluso mediante inhalación, inyección, transfusión, implantación o trasplante de aerosol.
35 Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.) o intraperitoneal. En un aspecto, las composiciones de células T de la divulgación se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En un aspecto, las composiciones de células T de la divulgación son administradas por i. v. inyección. Las
40 composiciones de células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NK) pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

En un aspecto ejemplar particular, los sujetos pueden sufrir leucoféresis, 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, células T. Estos aislados de células T pueden expandirse mediante métodos conocidos en la técnica y tratarse de manera que se puedan introducir una o más construcciones CAR o CAR de próxima generación de la divulgación, creando así una célula CAR-T de la divulgación. Los sujetos que lo necesiten pueden someterse posteriormente a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de un trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertos aspectos, después del trasplante o simultáneamente con él, los sujetos reciben una infusión de las células CAR-T expandidas de la divulgación. En un aspecto adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

En una realización, el CAR se introduce en células efectoras inmunes (por ejemplo, Células T, células NKT), por ejemplo, Usando transcripción in vitro, y el sujeto (por ejemplo, Humano) recibe una administración inicial de CAR o CAR de próxima generación células efectoras inmunes (por ejemplo, células T, células NKT) de la divulgación, y una o más administraciones posteriores de las células efectoras inmunitarias CAR o CAR de próxima generación (por ejemplo, células T, células NK) de la divulgación, en las que una o más las 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. En una realización, se administra más de una administración de las células efectoras inmunitarias CAR o CAR de próxima generación (por ejemplo, células T, células NK) de la divulgación al sujeto (por ejemplo, humano) por semana, por ejemplo, 2, 3 o Se administran 4 administraciones de las células efectoras inmunitarias CAR o CAR de próxima generación (por ejemplo, células T, células NK) de la divulgación por semana. En una realización, el sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) recibe más de una administración de las células efectoras inmunes CAR (por ejemplo, células T, células NK) por semana (por ejemplo, 2, 3 o 4 administraciones por semana) (también denominado en este documento como un ciclo), seguido de una semana sin CAR o administraciones de células efectoras inmunes con CAR de próxima generación (por ejemplo, células T, células NK), y luego una o más administraciones adicionales de CAR o de células efectoras inmunes de CAR de próxima generación (por ejemplo, Células T, células NK) (por ejemplo, se administra más de una administración de las células efectoras inmunitarias CAR o CAR de próxima generación (por ejemplo, células T, células NK) por semana) al sujeto. En otra realización, el sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) recibe más de un ciclo de CAR o células efectoras inmunitarias CAR de próxima generación (por ejemplo, células T, células NK), y el tiempo entre cada ciclo es menor que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 días. En una realización, las células efectoras inmunitarias CAR o CAR de próxima generación (por ejemplo, células T, células NK) se administran cada dos días durante 3 administraciones por semana. En una realización, las células efectoras inmunitarias CAR (por ejemplo, células T, células NK) de la divulgación se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

Un problema potencial que puede surgir en pacientes que están siendo tratados usando CAR de expresión transitoria o células efectoras inmunitarias CAR de próxima generación (por ejemplo, células T, células NK) (particularmente con scFv murino que llevan CAR-Ts) es la anafilaxia después de múltiples tratamientos.

Sin estar ligado a 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 experimentan un cambio de clase del isotipo IgG (que no causa anafilaxia) al isotipo IgE cuando hay una interrupción de diez a catorce días en la exposición al antígeno.

Si un paciente tiene un alto riesgo de desarrollar una respuesta anafiláctica a la terapia CAR o CAR de próxima generación o generar una respuesta de anticuerpos CAR de tipo IgE durante el curso de la terapia CAR o CAR de próxima generación, entonces omalizumab (Xolair) se puede administrar antes o durante la terapia CAR o CAR de próxima generación.

Si un paciente tiene un alto riesgo de generar una respuesta de anticuerpos anti-CAR durante el curso de la terapia con CAR transitoria o con CAR de próxima generación (como las generadas por las transducciones de ARN), las interrupciones en la infusión de CAR-T no deberían durar más de diez a catorce días.

También se proporcionan kits para practicar la divulgación. Por ejemplo, kits para tratar un cáncer en un sujeto, o hacer una célula CAR-T que expresa uno o más de los CAR o CAR de próxima generación descritos en este documento. Los kits pueden incluir una molécula de ácido nucleico o una molécula de polipéptido que codifica un CAR o un CAR de próxima generación o un vector que codifica un CAR o un CAR de próxima generación junto con un método para introducir el ácido nucleico en las células efectoras inmunes. El kit puede incluir un virus que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR o CAR de próxima generación y productos químicos, como polibreno, para mejorar la transducción del virus. El kit puede contener componentes para el aislamiento de células T para expresar un CAR o CAR de próxima generación. Alternativamente, el kit puede contener células efectoras inmunes (por ejemplo, células T o células NK) o células madre que expresan un CAR o CAR de próxima generación. En el kit se puede incluir más de uno de los CAR descritos. El kit puede incluir un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con él.

Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene típicamente una composición que incluye una o más de las moléculas de ácido nucleico, virus, vectores, células T que expresan un CAR o CAR de próxima generación. En varias realizaciones, el recipiente puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Una etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección particular. La etiqueta o prospecto típicamente incluirá además instrucciones para el uso de moléculas de ácido nucleico, CAR o CAR de próxima generación o células T que expresan un CAR o CAR de próxima generación, por ejemplo, en un método para tratar o prevenir un tumor o para hacer una célula CAR-T. El prospecto incluye típicamente instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y / o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos. Los materiales de instrucción pueden estar escritos, en forma electrónica (como un disquete de computadora o disco compacto) o pueden ser visuales (como archivos de video). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la que está diseñado el kit. Así, por

ejemplo, el kit puede contener adicionalmente medios para medir la expresión de CAR o CAR de próxima generación en células T o para determinar el número o porcentaje de células T que expresan CAR o para determinar la funcionalidad de células CAR-T. Los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros reactivos utilizados habitualmente para la práctica de un método particular. Dichos kits y contenidos apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los modelos animales también se pueden usar para medir la actividad de CAR. Por ejemplo, se puede usar el modelo de xenoinjerto usando célula T de CAR+ específicas de antígeno asociado a cáncer humano descritas en la presente para tratar una pre-B-ALL humana primaria en ratones inmunodeficientes. Ver, por ejemplo, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(S): 1453-1464 (2009).

La respuesta de tratamiento con CAR dependiente de la dosis se puede evaluar. Ver, por ejemplo, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(S): 1453-1464(2009).

La evaluación de la proliferación celular y producción de citocinas se ha descrito previamente, por ejemplo, en Milone et al., *Molecular Therapy* 17(S): 1453-1464 (2009).

La citotoxicidad se puede evaluar mediante el ensayo Matador o usando un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr. Véase, por ejemplo, Milone et al., *Molecular Therapy* 17 (8): 1453-1464 (2009).

Se pueden utilizar tecnologías de formación de imágenes para evaluar el tráfico específico y la proliferación de zSIR en modelos animales portadores de tumores. Tales ensayos se han descrito, por ejemplo, en Barrett et al., *Human Gene Therapy* 22: 1575-1586 (2011). También se pueden usar otros ensayos, incluidos los descritos en la sección de Ejemplos del presente documento, así como los que se conocen en la técnica, para evaluar el CAR descrito en el presente documento.

EJEMPLOS

La actividad de un CAR se puede probar mediante varios ensayos in vitro e in vivo descritos en el presente documento y a continuación. A continuación se proporciona un esquema general para generar, seleccionar y utilizar los CAR adecuados:

Identificación de objetivo para la generación de CAR. Un objetivo adecuado contra el cual se diseña el CAR se selecciona con base en la búsqueda en la literatura o en las bases de datos de expresión génica. En general, un objetivo adecuado para un CAR muestra una mayor expresión en las células causantes de la enfermedad o asociadas a la enfermedad en comparación con las células sanas normales.

Generación de CAR. Una vez que se identifica un antígeno objetivo candidato para SIR, el dominio de unión al antígeno de CAR se diseña con base en la información disponible en la literatura. En general, el dominio de unión al antígeno de SIR se basa típicamente en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, scFV o dominios de vHH de camélido. Las secuencias de las cadenas variables de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de anticuerpos, los dominios de vHH de camélido y diversos receptores y ligandos se pueden obtener por secuenciación o por bases de datos públicamente disponibles y se pueden usar para la síntesis de un CAR usando los métodos descritos en la presente como se muestra en diferentes ejemplos. Las secuencias que comprenden los dominios de unión al antígeno de CAR se optimizan en codones y se sintetizan artificialmente usando software disponible públicamente (por ejemplo, ThermoFisher o IDT) y proveedores comerciales (por ejemplo, IDT). Los fragmentos resultantes se amplifican por PCR y se clonan en diferentes vectores que contienen los

diferentes esqueletos de SIR usando técnicas estándar de biología molecular. Las diferentes cadenas principales de CAR se describen en los documentos WO 2016/187349 A1, PCT / US2016 / 058305, US 62 / 429,597, PCT / US17 / 64379 y PCT / US2017 / 024843, que se incorporan en su totalidad aquí como referencia. En general, los constructos de CAR se clonan típicamente en un vector lentiviral. La

5 Otra construcción ejemplar que codifica un zSIR es pLenti-EF1 α -CD8SP-BCMA-Am06-HL-vL-IgCL-Bam-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-Bst-BCMA-Am06-HL-vH-IgG1-CH1-KPN-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-Xba-PAC-DWPRE (SEQ ID NO: 154). Este constructo tiene muchos sitios de restricción convenientes, de manera que los fragmentos del dominio de unión al antígeno (por

10 ejemplo, dominios vL y vH) se pueden cortar y reemplazar con los fragmentos del dominio de unión al antígeno que se dirigen a otros antígenos. El vector lleva un sitio Nhe I corriente arriba del péptido señal CD8 (CD8SP), que también se puede usar junto con el sitio Xho I para clonar en un nuevo fragmento vL que lleva un péptido señal 5'. Los sitios BstB I y Mlu I pueden usarse para reemplazar el fragmento vH. Los sitios Xho I y Spe I se pueden utilizar para reemplazar el módulo que codifica IgCL- [IgCL-Bam-

15 CD3zECDTMCP-opt-F-P2A por un módulo diferente. De manera similar, los sitios MluI y Xba pueden usarse para reemplazar el módulo que contiene IgG1-CH1-KPN-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A. El módulo accesorio que codifica PAC se puede reemplazar usando los sitios de restricción Xba I (o Nde I) y Sall. Por lo tanto, una persona con habilidades ordinarias en la técnica puede usar este vector y la secuencia del dominio de unión al antígeno (por ejemplo, los dominios vL y vH de un anticuerpo) para

20 generar CAR dirigidos a cualquier otro antígeno nuevo.

Generación de proteínas de fusión secretoras de antígeno-NLuc y proteínas de fusión de dominio de unión a antígeno (ABD) -NLuc. (Paso opcional).

Se generaron proteínas de fusión de antígeno secretor-NLuc y proteínas de fusión de dominio de unión a antígeno (ABD) -NLuc y se usaron como se describe en PCT / US2017 / 025602,

25 que se incorpora aquí en su totalidad como referencia. Se prueba un panel de líneas celulares para determinar la unión a la proteína de fusión ABD-NLuc para identificar líneas celulares que expresan un alto nivel de diana de CAR y, por lo tanto, se pueden usar para probar la actividad de CAR. La Tabla A proporciona una lista ejemplar de líneas celulares que expresan diferentes dianas de antígenos que se pueden usar para analizar la actividad de un CAR de esta divulgación. Las líneas celulares que

30 expresan la diana de CAR también pueden identificarse usando métodos alternativos tales como búsqueda en la literatura, inmunotinción con anticuerpos disponibles comercialmente o buscando bases de datos de expresión génica disponibles públicamente.

Las células efectoras inmunes que expresan CAR se prueban en los siguientes ensayos para identificar el CAR funcional.

35 **A) Ensayo de Topanga (ensayo de unión a NLuc):** Las células Jurkat-NFAT-GFP o T que expresan el vector de control y CAR se tiñen con la proteína de fusión Antígeno-NLuc objetivo (como se describió anteriormente) y su capacidad para unirse al antígeno objetivo se somete a ensayo midiendo la actividad de NLuc. Por ejemplo, las células Jurkat-NFAT-GFP que expresan CAR basado en FMC63 dirigido a CD19 muestran una unión aumentada a la proteína de fusión CD19-NLuc en

40 comparación con el vector de control que expresa células Jurkat-NFAT-GFP o células Jurkat-NFAT-GFP parentales.

(B) Inducción de expresión de GFP impulsada por promotor de NFAT. El Jurkat-NFAT-GFP que expresa vector de control y CAR se cocultiva durante 4-24 horas con la línea celular que expresa el antígeno objetivo (descrito anteriormente) y su capacidad para unirse al antígeno objetivo se analiza por la medición de la inducción de la expresión de GFP usando citometría de flujo. El sobrenadante celular se recolecta y se analiza para la inducción de citocinas (por ejemplo, IL2).

(C) Ensayo para la producción de citocinas: El Jurkat-NFAT-GFP que expresa vector de control y SIR o células T se cocultiva con las líneas celulares objetivo durante 4-96 horas y el sobrenadante se examina para la inducción de citocinas (*por ejemplo*, IL2, IFN γ , TNF α , etc.) expresadas usando ELISA.

(D) Ensayo de Actividad Citotóxica *in vitro* e *in vivo*: Las células T no infectadas o aquellas que expresan un vector de control o CAR se cultivan conjuntamente con las líneas celulares objetivo que expresan una forma no secretora de aluciferasa (tal como GLuc, NLuc, Turboluc 16, etc.) durante 4-96 horas y la inducción de la lisis de células se examina midiendo la actividad de luciferasa como se describe en PCT/US17/52344. También se pueden usar métodos alternativos para medición de la actividad citotóxica (*por ejemplo*, ensayo de liberación de ^{51}Cr o ensayo de liberación de LDH). La actividad de las células T que expresan un CAR también se puede analizar *in vivo* usando modelos de xenoinjerto apropiados en ratones inmunodeficientes.

Con base en los métodos anteriores, una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede diseñar, construir, probar y seleccionar fácilmente el CAR o conjunto de CAR apropiado contra cualquier antígeno. El CAR o un grupo de CAR se pueden usar para ensayos clínicos en humanos y para uso clínico para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades. La Tabla 11 proporciona una lista ejemplar de afecciones de enfermedades humanas que se pueden tratar usando los CAR de la descripción.

Es posible que los diferentes CAR o subconjunto de CAR son adecuados de forma óptima para diferentes afecciones de enfermedad dependiendo de varios factores incluyendo, pero no limitado a, la prevalencia y nivel de expresión del antígeno objetivo en las células causantes de la enfermedad y asociadas a la enfermedad, carga de la enfermedad y velocidad de progresión de la enfermedad. Diferentes CAR pueden ser óptimamente adecuados incluso para una afección de enfermedad única en diferentes pacientes dependiendo de su eficacia y perfil de toxicidad y la condición del paciente. La descripción proporciona una solución a los importantes obstáculos técnicos y logísticos para generar una respuesta inmune adoptiva diversa.

La diversidad TCR normal se produce por reordenamiento genético. Los rigurosos procesos de selección positiva y negativa en el timo aseguran que solo las células T que expresan el TCR $\alpha\beta$ que están restringidas al reconocimiento de auto-péptidos/MHC dentro del rango de baja afinidad pueden poblar la periferia. Por lo tanto, el entorno tímico permite la generación de un conjunto de células T $\alpha\beta$ que son auto-restringidas, pero no auto-reactivas.

La generación de un grupo diverso de CAR de dominios de unión al antígeno diferente está limitada por las barreras técnicas y económicas de generación y prueba de múltiples dominios de unión al antígeno. Más importante aún, ya que cada uno de los dominios de unión al antígeno (por ejemplo, los fragmentos vL y vH de un anticuerpo) tiene el potencial de unirse a otros antígenos y causar toxicidad fuera del objetivo, un grupo diverso de CAR basado en una pluralidad de dominios de unión

al antígeno potencialmente tiene un mayor riesgo de toxicidad. Por lo tanto, la diversidad potencial de tal grupo tendría que limitarse para reducir la toxicidad fuera del objetivo. La descripción actual supera este problema al generar un grupo diverso de CAR a partir de uno o unos pocos dominios de unión al antígeno al unirlos a diferentes variantes de cadenas de TCR. La diversidad del grupo de CAR se

5 aumenta adicionalmente por el uso de diferentes enlazadores. La diversidad de células T que expresan el grupo se puede aumentar adicionalmente por el uso de diferentes módulos accesorios y controles terapéuticos descritos en la descripción.

Este grupo diverso de SIR se puede usar para proporcionar una respuesta inmune diversa contra las células causantes de la enfermedad o células asociadas a la enfermedad que expresan el

10 antígeno. Alternativamente, el grupo diverso de SIR puede ser opcionalmente codificado de barras de ADN usando técnicas conocidas en la técnica y posteriormente usarse para seleccionar un único SIR o un subgrupo de SIR con características biológicas y clínicas óptimas. Estas características pueden incluir, pero no se limitan a, el rendimiento en los ensayos biológicos in vitro (por ejemplo, citotoxicidad, secreción de citocinas, afinidad de unión, expresión en la superficie celular, efectos fuera de objetivo,

15 proliferación de células T, expresión de marcadores de agotamiento y diferenciación de terminal etc.), rendimiento en los ensayos in vivo (por ejemplo, supervivencia, reducción de tumor, persistencia de células T, expansión de células T, etc.) y experiencia clínica (por ejemplo, remisión de la enfermedad, tasa de recaída, toxicidad, etc.). Los CAR de la divulgación se pueden usar solos o en combinación con otros receptores inmunes naturales y sintéticos conocidos en la técnica para generar un grupo diverso

20 de células efectoras inmunes para la prevención y el tratamiento de diversas afecciones de enfermedad causadas o asociadas con células que expresan sus antígenos objetivo.

Los fragmentos de genes que codifican los diferentes péptidos señal, dominios de unión de anticuerpos, enlazadores, cadenas constantes de TCR, enlazadores escindibles y marcadores de selección (por ejemplo, PAC, EGFP, CNB30, etc.) se sintetizaron artificialmente en fragmentos únicos

25 o múltiples usando un proveedor comercial (IDT) y se usaron como plantillas en reacciones de PCR con cebadores que contienen enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos amplificados se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas y luego se clonaron en pLENTI-EF1 α (SEQ ID NO: 129), pLENTI-EF1 α -DWPRE (SEQ ID NO: 130), pCCLc-MNDU3-WPRE (SEQ ID NO: 12639) o vectores MSCV-Bgl2-AvrII-Bam-EcoR1-Xho-BstB1-Mlu-Sal-ClaI.I03 (SEQ ID NO: 131) usando técnicas

30 estándar de biología molecular. Los fragmentos CAR se clonaron entre los sitios Nhe I y Sal I en pLENTI-EF1 α (SEQ ID NO: 129), pLENTI-EF1 α -DWPRE (SEQ ID NO: 130), pCCLc-MNDU3-WPRE (SEQ ID NO: 12639) vectores. El fragmento resultante luego se puede usar como plantilla en la reacción de PCR con cebadores que contienen enzimas de restricción apropiadas. El fragmento amplificado se puede digerir con enzimas de restricción apropiadas y luego se clona en el vector

35 apropiado usando técnicas estándar de biología molecular.

Las líneas celulares modificadas para expresar las luciferasas (por ejemplo, Gluc o NLuc) para medir la citotoxicidad de diferentes constructos dirigidos a diferentes antígenos de superficie celular e intracelulares están dentro de la **Tabla A**. Las líneas celulares usadas en estos experimentos, antígenos objetivo en las líneas celulares y su medio de crecimiento se muestran en la siguiente **Tabla A**. Las

40 células se cultivaron a 37°C, en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Las líneas celulares se obtuvieron de ATCC, programa de reactivos para SIDA NIH o estuvieron disponibles en el laboratorio.

Tabla A:

Línea celular	Condiciones de Cultivo	Antígenos Objetivo de SIR Ejemplares Expresados
BC-1	RPML, 20% de FCS	BCMA, GPRC, CD138
BC-3	RPML, 20% de FCS	BCMA, GPRC, CD138
BCBL-1	RPML, 20% de FCS	GPRC, CD138
JSC-1	RPML, 20% de FCS	GPRC, CD138
MM1S	RPML, 10% de FCS	CD38, GPRC, CD44, CD200R
U266	RPML, 10% de FCS	BCMA, WT1/HLA-A2+, CS1, CLL1, CD138, c-MET, IL6R, CD179b, NY-ESO/HLA-A2, NYBR, LAMP1
L363	RPML, 10% de FCS	BCMA, GPRC, WT1/HLA-A2+, CS1, CLL1, CD138, NY-ESO/HLA-A2, NYBR, LAMP1
K562	RPML, 10% de FCS	CD33, IL1Ra, TnAg
BV173	RPML, 10% de FCS	CD123, CD179b, IL1Ra, WT1/HLA-A2+, CXCR4, FLT3, CD179a
Nalm6	RPML, 10% de FCS	CD19, CD20, CD22, CD179b, CD179a
HL60	RPML, 10% de FCS	CD33, CD34, CLL1, IL6R, CD32, CD179
U937	RPML, 10% de FCS	CD4, CLL1
RS4:11	RPML, 20% de FCS	CD19, receptor beta de folato (FRbeta), TGFbeta, CD179b, NKG2D, FLT3, CD179a, CD133
MV4;11	RPML, 10% de FCS	FLT3, CD123, FRbeta
Raji	RPML, 10% de FCS	CD19, CD20, CD22, BCMA, CD38, CD70, CD79, receptor beta de folato, CLL1
HEL-92.1.7 (HEL)	RPML, 10% de FCS	MPL, CD33, CD32, CD200R, Cripto
Jurkat	RPML, 10% de FCS	TnAg, TSLRP, TSHR, CD4, CD38
Daudi	RPML, 10% de FCS	BCMA, FRbeta
REC-1	RPML, 10% de FCS	NKG2D, ROR1, CD19, FCRH5, BAFF-R
KG-1	RPML, 20% de FCS	CD33, CD34, CD123, TSLRP, EMR2, VISTA, BST1
CEM	RPML, 10% de FCS	CD5, CD43
U937	RPML, 10% de FCS	CD4, CLL1
LAMA5	RPML, 10% de FCS	WT1/HLA-A2
A549	DMEM, 10% de FCS	ROR1, CD22, TIM1, CDH17
HT29	DMEM, 10% de FCS	EGFR, SLEA, c-MET
Molm-13	RPML, 20% de FCS	FLT3, IL6R, LAMP1, TSLRP, CD4, CSF2RA, CXCR4, IL6R, CSF2RA, GPC3, EMR2, BST1
A431	DMEM, 10% de FCS	EGFR, receptor alfa de folato (FOLR1), Her3
P19	DMEM, 10% de FCS	SSEA
THP-1	RPML, 10% de FCS	CD32, CD33, CXCR4, CD123, CD44, IL6R, receptor beta de folato, CD70, LAMP1, FLT3, CSF2RA, IL1RAP
U87MG	DMEM, 10% de FCS	CD276, gpNMB, IL13RA2, MMP16
LoVo	DMEM, 10% de FCS	Tissue Factor, CDH17, EGFR, CEA, RNF43
SKOV-3	DMEM, 10% de FCS	receptor alfa de folato (FR1), FSHR, Her2, Her3, LHR, MSLN, TIM1, EPCAM
NCI-H1993	DMEM, 10% de FCS	EGFR
Kasumi-1	RPML, 20% de FCS	CLEC5A, PR1/HLA-A2, TGFbeta,
Jeko-1	RPML, 20% de FCS	BCMA, ROR1, BAFF-R
PC-3	DMEM, 10% de FCS	CGH, TROP2, PSCA, PSMA. EPCAM, FSHR, CLD18A2 (CLDN18.2), STEAP1
HeLa	DMEM, 10% de FCS	EGFR, FR1, MSLN, TSHR
LNCaP	DMEM, 10% de FCS	EGFR, FSHR, PSCA, PSMA, CD22, Her3, LHR, CLD18A2 (CLDN18.2), STEAP1, BMPR1B
OVCAR-3	DMEM, 10% de FCS	B7H4, CDH6, DLL3, FR1, FSH, LHR, MSLN, PTK7, TnAg, TSHR, L1CAM, LYPD1, CLDN6, UPK1B, CD133, SLC34A2
MEL-624	DMEM, 10% de FCS	CDH19, GD2, GD3, gp100/HLA-A2, gpNMB, HMWMAA, NYESO/HLA-A2, MART1/HLA-A2
LS174-T	DMEM, 10% de FCS	CEA

Línea celular	Condiciones de Cultivo	Antígenos Objetivo de SIR Ejemplares Expresados
MEL-526	DMEM,10% de FCS	GD2
MDA-MB231	DMEM,10% de FCS	CD324, Muc1
MDA-MB-453	DMEM,10% de FCS	Nectin-4,; WISP1
L1236	RPMI, 20% de FCS	CD30, CD23, PDL1
L428	RPMI, 20% de FCS	CD30, CD123, CCR4, PDL1
L540	RPMI, 20% de FCS	CD30, CCR4, PDL1
Molt-16	RPMI, 20% de FCS	IL1ra, NKG2D
CEM	RPMI, 10% de FCS	CD5
MG-63	DMEM,10% de FCS	IL13RA2
Karpas-299	RPMI, 20% de FCS	Alk, GPRC, PDL1
MCF7	DMEM,10% de FCS	B7D4, CD276, TROP2, Her3, Muc1, LewisY, LHR, Receptor de prolactina (PRLR), Liv-1
AA-2	RPMI, 10% de FCS	Glicoproteína de envoltura de VIH1 (gp120)
HL2/3	DMEM,10% de FCS	Glicoproteína de envoltura de VIH1 (gp120)
TF228.1.16	DMEM,10% de FCS	Glicoproteína de envoltura de VIH1 (gp120), CCR4
TT	DMEM,10% de FCS	TGF-Beta, TSHR, GFRalpha4
DMS79	RPMI, 10% de FCS	Fucosil-GM1, Slea (CA19.9; antígeno de Sialil Lewis)
LAN-5	DMEM,10% de FCS	ALK, DLL3, GFRalpha4, FUCOSIL-GM1
PEER1	RPMI, 10% de FCS	TSHR
SK-MEL-37	DMEM,10% de FCS	DLL3, GD2
F9	DMEM,10% de FCS	SSEA
HepG2	DMEM,10% FBS	GPC3, AFP/HLA-A2, CLDN6

La línea celular Jurkat (clon E6-1) modifica con un gen reportero GFP dependiente de NFAT fue un regalo del Dr. Arthur Weiss en UCSF. Las células Jurkat se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%, penicilina y estreptomicina.

- Generación de lentivirus y retrovirus.** Los lentivirus se generaron por transfección basada en fosfato de calcio en células 293FT esencialmente como se describió anteriormente (Matta, Hozayev, Tomar, Chugh and Chaudhary, 2003). Se cultivaron células 293FT en DMEM con FCS al 10% 4 mM de L-glutamina, aminoácidos no esenciales de MEM 0.1 mM y piruvato de sodio de MEM 1 mM (en lo sucesivo llamado DMEM-10). Para la generación de lentivirus, las células 293FT se colocaron en placas en 10 ml de medio DMEM-10 sin antibióticos en una placa de cultivo de tejido de 10 cm, de manera que queden aproximadamente 80 confluentes el día de la transfección. Al día siguiente, las células se transfectaron por el método de transfección con fosfato de calcio usando 10 µg de plásmido de expresión lentiviral que codifica diferentes genes, 7.5 µg de plásmido PSPAX2 y 2 µg de plásmido PLP/VSVG. En algún experimento, la mezcla de transfección también contenía entre 2,5 y 5 µg de un plásmido que codifica Vif de HIV1 (SEQ ID NO: 11269). Aproximadamente 15-16 horas después de la transfección, se removieron 9 ml de medio y se reemplazaron con 5 ml de medio fresco. Aproximadamente, 48 horas después de la transfección, se recolectaron 5 ml de sobrenadante (primera recolección) y se reemplazaron con 5 ml medio fresco. Aproximadamente 72 horas después de la transfección, se recolectaron todos los medios (segunda recolección), usualmente alrededor de 6 ml). Los sobrenadantes recolectados se reunieron y se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto para remover los residuos celulares y las células no adherentes. El sobrenadante libre de células se filtró a través de un filtro de jeringa de 0.45 µm. En algunos casos, el sobrenadante se concentró adicionalmente por ultra centrifugación a 18500 rpm durante 2 horas a 4°C. El sedimento viral se resuspendió en 1/10 del volumen inicial en medio XVIVO. El virus se utilizó fresco para infectar las células objetivo o se almacenó congelado en alícuotas a -80°C.

Infección de las células T y PBMC. Las células de la capa leucocitaria se obtuvieron de donantes adultos desidentificados sanos del Banco de Sangre en el Hospital de Niños de Los Ángeles y se usaron para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. Las PBMC se usaron como tales o se usaron para aislar células T usando microperlas magnéticas de CD3 (Miltenyi Biotech) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las PBMC o células T aisladas se resuspendieron en medio XVIVO (Lonza) suplantado con 10 ng/ml de anticuerpo CD3, 10 ng/ml de anticuerpo CD28 y 100 UI de IL2 humana recombinante. Las células se cultivaron a 37°C, en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Las células se activaron en el medio anterior durante 1 día antes de la infección con vectores lentivirales. En general, las células primarias (por ejemplo, células T) se infectaron en la mañana usando infección por centrifugación (1800 rpm durante 90 minutos a 37°C con 300 µl de virus concentrado que se había vuelto a suspender en medio XVIVO en la presencia de 8 µg/ml de Polybrene® (Sigma, Catálogo No. H9268). Se cambió el medio por la noche y se repitió la infección durante dos días más para un total de 3 infecciones. Después de la 3a infección, las células se sedimentaron y se resuspendieron en medio XVIVO fresco que contenía 10 ng/ml de anticuerpo CD3, 10 ng/ml de anticuerpo CD28 y 100 UI de IL2 humana recombinante y se suplementaron con los antibióticos respectivos (si está indicado) y se colocaron en el matraz de cultivo celular para selección, a menos que se indique lo contrario. Las células se cultivaron en el medio anterior durante 10-15 días en el caso que no se usara la selección de fármacos y durante 20-30 días en el caso que se usara la selección de fármacos. En los casos en que las células se infectaron con un lentivirus que expresaba EGFP, se expandieron sin selección de fármacos o se clasificaron por flujo para enriquecer las células que expresan EGFP. Para la infección de líneas celulares de cáncer, aproximadamente 500,000 células se infectaron con 2 ml del sobrenadante viral no concentrado en un volumen total de 3 ml con Polybrene® (Sigma, Catálogo no. H9268). Luego, a la mañana siguiente, las células se sedimentaron y se resuspendieron en los medios con los antibióticos respectivos y se colocaron en el matraz de cultivo celular para la selección.

Esencialmente, se utilizó un procedimiento similar al descrito anteriormente para la producción de vectores de lentivirus para la generación de vectores retrovirales, con la excepción que las células 293FT se transfectaron generalmente en placas de cultivo de tejidos de 10 cm en 10 ml de medio DMEM-10 usando 10 µg de constructo retroviral, 4 µg de pKAT y 2 µg de plásmido VSVG. La recolección de virus y la infección de las células objetivo se realizaron esencialmente como se describe anteriormente para los vectores lentivirales.

Anticuerpos y fármaco. La digitonina se adquirió en Sigma (Cat. No D141) y se preparó una solución madre de 100 mg/ml en DMSO. Se hizo una solución madre diluida de 1 mg/ml en PBS. La concentración final de digitonina usada para la lisis de células fue 30 µg/ml, a menos que se indique lo contrario.

Fabricación y administración de CAR-T de grado clínico.

Para la fabricación de CAR-T de grado clínico, los lentivirus de grado cGMP que codifican los CAR se generan utilizando fuentes comerciales (por ejemplo, Lentigen, Lonza, etc.). Las células T se recogen de donantes (autólogos o alogénicos) mediante leucocitaféresis. Las células CAR-T se fabrican utilizando el sistema cerrado automatizado CLINIMAC Prodigy (Miltenyi Biotech) como se describe (Zhu F, Shah N et al, Citoterapia, 2017) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utiliza la multiplicidad

de infección (MOI) de entre 5 y 10. Se conocen en la técnica métodos alternativos para la fabricación de CAR-T de grado clínico, tales como Cocoon (Lonza) y sistemas abiertos manuales, y se pueden usar en una realización alternativa de la invención. Las células CAR-T se administran al paciente después de la quimioterapia de depleción linfóide a dosis crecientes comenzando en aproximadamente 1×10^6 células CAR-T CD3 / kg.

ELISA de IL2. Se midieron IL2, IFN γ , IL6 y TNF α humanos en el sobrenadante del cultivo celular de células efectoras Jurkat-NFAT-GFP que expresan CAR o linfocitos T que se habían cocultivado con las líneas celulares diana específicas durante 24 a 96 horas utilizando kits de ELISA de Sistemas de R&D (Minneapolis, MN) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis de FACS. El anticuerpo monoclonal conjugado a APC de c-Myc anti-humano de ratón (Catálogo # IC3696A) fue de R&D Systems (Minneapolis, MN). La proteína L biotinilada se adquirió de GeneScript (Piscataway, NJ), se reconstituyó en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) a 1 mg/ml y se almacenó a 4°C. La estreptavidina-APC (SA1005) se adquirió de ThermoFisher Scientific.

Para la detección de CAR usando tinción con Myc, 1×10^6 células se recolectaron y lavaron tres veces con 3 ml de $1 \times$ PBS enfriado con hielo que contenía amortiguador de lavado de albúmina de suero bovino (BSA) al 4%. Después del lavado, las células se resuspendieron en 0.1 ml del amortiguador de lavado enfriado con hielo que contenía 10 μ l de anticuerpo Myc conjugado con APC y se incubaron en la oscuridad durante 1 hora seguido de dos lavados con amortiguador de lavado enfriado con hielo.

Para la detección de CAR usando tinción con proteína L, 1×10^6 células se recolectaron y se lavaron tres veces con 3 ml de $1 \times$ PBS enfriado con hielo que contenía amortiguador de lavado de albúmina de suero bovino (BSA) al 4%. Después del lavado, las células se resuspendieron en 0.1 ml del amortiguador de lavado enfriado con hielo que contenía 1 μ g de proteína L a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron tres veces con amortiguador de lavado enfriado con hielo y luego se incubaron (en la oscuridad) con 10 μ l de estreptavidina conjugada con APC en 0.1 ml de amortiguador de lavado durante 30 minutos, seguido de dos lavados con amortiguador de lavado enfriado con hielo. FACS se realizó usando el analizador FACSVerse de BD Biosciences.

Ensayo de muerte celular. Para medir la muerte celular, se utilizó un nuevo ensayo basado en la expresión citosólica ectópica de Gluc o NLuc, como se describe en PCT/US17/52344 "Un ensayo de citotoxicidad no radioactiva".

Desarrollo de un ensayo para detectar la expresión de CAR y sus antígenos. Para detectar la expresión de CAR y sus antígenos diana, se utilizó un ensayo indicador basado en luciferasa, denominado Ensayo Matador, como se describe en PCT/US2017/ 025602 "Un ensayo indicador basado en luciferasa altamente sensible y específico para la detección de antígenos".

Ensayo de Jurkat NFAT-GFP para receptores inmunes sintéticos. Las células Jurkat-NFAT-GFP se modificaron de manera que el promotor de IL-2, que porta los sitios de unión de NFAT, se clonó cadena arriba del gen GFP. Estas células se han usado para estudiar la señalización a través de TCR y CAR. Los diferentes CAR se expresaron de forma estable en células Jurkat NFAT-GFP por transferencia génica mediada por lentivirus, seguido de selección con puromicina. Las células Jurkat-NFAT-GFP que expresan CAR se cocultivaron con las células objetivo en una relación de E:T de

aproximadamente 1:2 durante aproximadamente 4 horas a 18 horas. Cuando la interacción entre los CAR y su antígeno objetivo da como resultado la activación de la vía de NFAT, se induce la expresión de GFP. Por lo tanto, las células Jurkat-NFAT-GFP que expresan CAR muestran niveles aumentados de expresión de GFP cuando interactúan con líneas celulares objetivo que expresan el receptor para el

5 CAR.

La inducción de la expresión de GFP cocultivando las células Jurkat-NFAT-GFP que expresan diferentes constructos de SIR y las diferentes células objetivo, se estudió como se describió anteriormente (Wu, Roybal, Puchner, Onuffer, & Lim, 2015). La expresión de GFP se monitoreó por análisis FACS. Las células Jurkat-NFAT-GFP (parentales) se utilizaron como control. Los resultados

10 con diferentes CAR se resumen en la siguiente **Tabla 14** de resumen. Los nombres de los diferentes CAR, sus SEQ ID NO, los dominios de unión al antígeno del componente y las cadenas de TCR se pueden determinar con referencia a la Tabla 14. Un CAR se considera positivo en el ensayo en caso de que las células de Jurkat-NFAT-GFP que expresan CAR muestran un mayor% de GFP células

15 positivas cuando se cultivan con la línea celular diana en comparación con las células parentales Jurkat-NFAT-GFP. Por tanto, las células Jurkat-NFAT-GFP que expresan BCMA CAR representadas por SEQ ID NO: 495 mostraron una mayor inducción de expresión de GFP cuando se cocultivaron con las células L363 y U266 en comparación con las células Jurkat-NFAT-GFP parentales. Los signos +/-, +, 2+, etc. después del nombre de las líneas celulares indican el grado relativo de positividad en el ensayo Jurkat-

20 NFAT-GFP medido por el % de células positivas a GFP después del cultivo de células Jurkat-NFAT-GFP que expresan SIR con esa línea celular. Los resultados también demuestran que los diferentes CAR que contienen el dominio de unión derivado del mismo anticuerpo muestran una gran diversidad en su capacidad para activar la señalización de NFAT usando este ensayo cuando se exponen a la

línea celular idéntica dependiendo del tipo de CAR. Además, se observa una gran diversidad de respuesta contra la misma línea celular diana con células Jurkat que expresan CAR que contienen

25 diferentes dominios de unión a antígenos dirigidos al mismo antígeno (por ejemplo, CAR que tienen dominios de unión a antígeno derivados de diferentes anticuerpos BCMA) incluso cuando las CAR comparten el mismo Arquitectura CAR (por ejemplo, BBz CAR o SIR). Finalmente, las células Jurkat que expresan CAR dirigidos a diferentes antígenos (por ejemplo, CD19 vs CD20) muestran una diversidad de respuestas cuando se exponen a la misma línea celular objetivo. Por lo tanto, se puede

30 generar una respuesta inmune diversa contra una célula objetivo única combinando CAR con diferentes cadenas, enlazadores, dominios de unión al antígeno y especificidad de objetivo de TCR. La **Tabla 14A** también resume los resultados del ensayo de citotoxicidad de células T basada en GLuc ((Ensayo Matador) observado con CAR cuando se exponen a sus diferentes líneas de células objetivo. Los signos +/-, + y 2+, etc., indican el grado de citotoxicidad observado usando el ensayo de citotoxicidad de Gluc

35 después de un cocultivo de 4-96 horas de cocultivo de la línea celular objetivo con células T que expresan CAR en comparación con las células T de control, es decir, células T que no expresan CAR o un CAR irrelevante (por ejemplo, un CAR dirigido a un antígeno no expresado en la línea celular objetivo particular), cuando el ensayo se realiza bajo condiciones similares. Se observó una diversidad similar en la capacidad para inducir la producción de citocinas (por ejemplo, IL2, TNF α e IFN γ) entre

40 las células T que expresan diferentes CAR dependiendo de sus cadenas, enlazadores, dominios de unión al antígeno, especificidad de objetivo y la línea de células objetivo de TCR cuando se expusieron

a la línea celular objetivo bajo condiciones comparables. Sin embargo, la producción de citocinas por las células CAR-T cuando se exponen a sus células objetivo fue generalmente menor que la observada con células CAR-T comparables cuando el ensayo se realizó bajo condiciones similares. Las células T que expresan los diferentes CAR que contienen el mismo dominio de unión al antígeno pero diferentes cadenas y enlazadores de TCR también mostraron diferencias en la proliferación y expresión de marcadores de agotamiento cuando se analizaron bajo condiciones similares. En base a los resultados de este análisis, se seleccionaron diferentes dominios de unión a antígeno (por ejemplo, ScFv), enlazadores, tipo y clase de CAR y cadenas de TCR y sus configuraciones que fueron positivas en los ensayos de citotoxicidad de células T y NFAT-GFP para estudios adicionales.

TABLA 14

			ENSAYO DE NFAT-GFP	Ensayo de Citotoxicidad de Células T
Objetivo	SEQ ID NO	Nombre de construcciones	Líneas Celulares Positivas	Línea Celular Positiva
BCMA	446	CD8SP-BCMA-Am08-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	L363(2+), U266 (2+)	
BCMA	543	CD8SP-BCMA-BB-CAR02-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-BB-CAR02-vH-Myc-CD8TM-BBz		L363 (+), U266 (+)
BCMA	545	CD8SP-BCMA-BB-CAR02-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-BB-CAR02-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC		L363 (+), U266 (+)
BCMA	495	CD8SP-BCMA-Am14-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	L363(2+), U266 (2+)	L363(+), U266 (+)
BST1	8506	CD8SP-hu-BST1-A1-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-BST1-A1-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	Kasumi (+/-)	HL60 (+)
BST1	8604	CD8SP-hu-BST1-A3-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-BST1-A3-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	Kasumi (+/-), MOLM13 (+/-)	HL60 (+)
BST1	8553	CD8SP-hu-BST1-A2-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-BST1-A2-vH-Myc-CD8TM-BBz	HL60 (+/-)	
BST1	8602	CD8SP-hu-BST1-A3-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-BST1-A3-vH-Myc-CD8TM-BBz	Kasumi (2+), MOLM13 (+/-), HL60 (+/-)	
CD19	791	CD8SP-CD19-AM1-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-CD19-AM1-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	RAJI (2+), Nalm6 (+), REH (+/-)	
CD19	984	CD8SP-hu-CD19-USC1-LH4-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-CD19-USC1-LH4-vH-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (2+), Nalm6 (+), REH (+)	
CD19	742	CD8SP-CD19-9B7-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-CD19-9B7-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	RAJI (+), Nalm6 (+/-), REH (+/-)	

CD19	937	CD8SP-CD19-DART1-vL-Gly-Ser-Ligador-CD19-DART1-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	RAJI (2+), Nalm6 (2+)	RAJI (+), Nalm6 (+)
CD19	935	CD8SP-CD19-DART1-vL-Gly-Ser-Ligador-CD19-DART1-vH-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (2+), Nalm6 (2+)	
CD19	788	CD8SP-CD19-AM1-vL-Gly-Ser-Ligador-CD19-AM1-vH-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (2+), Nalm6 (2+)	
CD19	739	CD8SP-CD19-9B7-vL-Gly-Ser-Ligador-CD19-9B7-vH-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (2+), Nalm6 (2+)	
CD19	887	CD8SP-hu-CAT18-1-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (3+), Nalm6 (3+)	
CD19	838	CD8SP-hCD19-CAT17-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (4+), Nalm6 (3+)	RAJI (+)
CD19	3956	CD8-hCD19-EUK5-13-vL-IgCL-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-Bst-hCD19-EUK5-13-vH-IgG1-CH1-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	RAJI(2+), NALM6 (2+)	
CD19	8663	CD8SP-hu-Bu13-vL-[hTCRb-KAC-ECD-Bam-CD3zECDTMCP-opt]-F-P2A-SP-hu-Bu13-vH-[hTCRa-CSDVP-ECD-Kpn-CD3zECDTMCP-opt2]	RAJI (+), Nalm6 (+)	
CD19	8651	CD8SP-hu-Bu13-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-Bu13-vH-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (2+), Nalm6 (+)	RAJI (+/-), Nalm6 (+)
CD19	8655	CD8SP-hu-Bu13-vL-PG4SP-v2-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-hu-Bu13-vH-PG4SP-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	RAJI (2+), Nalm6 (2+)	
CD19	8654	CD8SP-hu-Bu13-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-hu-Bu13-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	RAJI (3+), Nalm6 (3+)	RAJI (+), Nalm6 (+), Bv173 (+)
CD19	8634	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-hu-Bu13-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-Bu13-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	RAJI (+), NALM6 (+/-)	RAJI (+), Nalm6 (+), Bv173 (+)
CD19	3955	CD8-hCD19-EUK5-13-vL-IgCL-Bam-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-Bst-hCD19-EUK5-13-vH-IgG1-CH1-KPN-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-Xba-PAC	RAJI (3+), NALM6 (2+)	
CD19	3961	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-CD19MM-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	RAJI (2+), NALM6 (2+)	
CD19-AFP	3964	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-AFP-61-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	RAJI(2+), NALM6(+)	
CD19-CD20	3963	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-CD20-2F2-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	RAJI(+), NALM6 (+)	
CD19-CD22	3966	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-hSC22-10-HL-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	RAJI(+), NALM6 (+)	

CD19-CD22	3965	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-CD22-h10F4v2-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	RAJI(+), NALM6 (+)	
CD19-CD123	3967	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-CD123-DART1-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	RAJI (+), NALM6 (+), L428(+)	
CD19-CD123	3962	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-CD123-DART2-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	RAJI (+), NALM6 (+), L428 (2+)	
CD19-WT1	3968	CD8SP-CD19Bu12-scFv-Xho-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-SP-WT1-Ab5-scFv-Mlu-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-PAC	RAJI(+), Nalm6 (+)	
CD20	1084	CD8SP-hu-Ubli-1-v4-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-Ubli-1-v4-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	RAJI (2+)	RAJI (+)
CD20	1082	CD8SP-hu-Ubli-1-v4-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-Ubli-1-v4-vH-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (2+)	RAJI (+)
CD20	1034	CD8SP-CD20-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (2+)	
CD22	1131	CD8SP-hCD19-hu-HA22-1-vL-Gly-Ser-Ligador-hCD19-hu-HA22-1-vH-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (2+), Nalm6 (+/-)	
CD44v6	1181	CD8SP-CD44v6-USC1-HL4-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	L363 (+/-) U266 (+/-)	
CLDN6	1526	CD8SP-CLDN6-USC2-LH4-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-CLDN6-USC2-LH4-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-PAC		HepG2 (+/-), OVCAR3 (+/-)
CLDN6	1523	CD8SP-CLDN6-USC2-LH4-vL-Gly-Ser-Ligador-CLDN6-USC2-LH4-vH-Myc-CD8TM-BBz	HepG2(+), OVCAR (+)	
CLDN6	1476	CD8SP-CLDN6-USC1-LH4-vL-Gly-Ser-Ligador-CLDN6-USC1-LH4-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	HepG2(+/-), OVCAR3 (+/-)	
CRIPTO	8879	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-hu-Cripto-L1H2-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-Cripto-L1H2-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC		HEL (+)
DLL3	1575	CD8SP-DLL3-AM6-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-DLL3-AM6-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-PAC	SKMEL 37 (+/-)	
DLL3	1622	CD8SP-DLL3-AM14-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	LAN5 (+), SKMEL 37 (+/-)	SKMEL 37 (+)
DLL3	1573	CD8SP-DLL3-AM6-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	LAN5 (+/-), SKMEL 37 (+/-)	
EGFRvIII	1771	CD8SP-EGFRviii-H2M1863N2-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-EGFRviii-H2M1863N2-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC		HeLa (+), HeLa EGFRvIII (+)

EGFRvIII	1769	CD8SP-EGFRvIII-H2M1863N2-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	Hela (+/-), HeLa EGFR (+/-), LoVo (+/-), A431(4+)	
EMR2	1915	CD8SP-EMR2-USC2-V4-vL-Gly-Ser-Ligador-EMR2-USC2-V4-vH-Myc-CD8TM-BBz	MOLM13 (+), HL60(+/-)	
FOLR1	2064	CD8SP-FOLR1-USC1-HL4-vL-Gly-Ser-Ligador-FOLR1-USC1-HL4-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	Hela (2+), A431 (+/-)	
gpA33	9026	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-hu-gpA33-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-gpA33-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC		MOLM13 (+)
GPC3	2210	CD8SP-GPC3-USC2-HL-V4-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	HepG (3+), MOLM13 (+/-)	
GPC3	2161	CD8SP-GPC3-USC1-HL-V4-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	HepG (3+), MOLM13 (+/-)	
Her2	2309	CD8SP-Her2-169-vL-Gly-Ser-Ligador-Her2-169-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC		MCF7 (+/-)
Her2	2457	CD8SP-Her2-XMT-1520-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-Her2-XMT-1520-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	MCF7(2+)	
Her2	2408	CD8SP-Her2-XMT-1518-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-Her2-XMT-1518-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	MCF7(+)	
Her2	2405	CD8SP-Her2-XMT-1518-vL-Gly-Ser-Ligador-Her2-XMT-1518-vH-Myc-CD8TM-BBz	MCF7(+)	
Her2	2454	CD8SP-Her2-XMT-1520-vL-Gly-Ser-Ligador-Her2-XMT-1520-vH-Myc-CD8TM-BBz	MCF7 (2+)	
Her2	2456	CD8SP-Her2-XMT-1520-vL-Gly-Ser-Ligador-Her2-XMT-1520-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	MCF7 (+/-)	
Her2	2405	CD8SP-Her2-XMT-1518-vL-Gly-Ser-Ligador-Her2-XMT-1518-vH-Myc-CD8TM-BBz	MCF7 (2+)	
Her2	2356	CD8SP-Her2-huMab4D5-D98W-vL-Gly-Ser-Ligador-Her2-huMab4D5-D98W-vH-Myc-CD8TM-BBz	MCF7 (+/-)	
IL1RAP	9242	CD8SP-IL1RAP-IAPB63-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-IL1RAP-IAPB63-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	MOLM13 (+/-)	MOLM13 (+)
IL1RAP	9222	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-IL1RAP-IAPB63-vL-Gly-Ser-Ligador-IL1RAP-IAPB63-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC		MOLM13 (+)
Integrin B7	2552	CD8SP-Hu-IntB7-MMG49-vL-Gly-Ser-Ligador-Hu-IntB7-MMG49-vH-Myc-CD8TM-BBz		L363 (+), U266 (+)
LYPD1	2650	CD8SP-LYPD1-HL-V4-vL-Gly-Ser-Ligador-LYPD1-HL-V4-vH-Myc-CD8TM-BBz	OVCAR3 (2+)	

MSLN	2849	CD8SP-MSLN-237-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-MSLN-237-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	SKOV3 (+)	SKOV3 (7+)
MSLN	2800	CD8SP-MSLN-5-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-MSLN-5-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	SKOV3 (+)	SKOV3 (5+)
MSLN	2944	CD8SP-MSLN-HuAM15-vL-Gly-Ser-Ligador-MSLN-HuAM15-vH-Myc-CD8TM-BBz	SKOV3 (+)	
MSLN	2749	CD8SP-MSLN-3-HL-AM-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	SKOV3 (+)	
MSLN	2798	CD8SP-MSLN-5-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	SKOV3 (+/-)	
MSLN	9435	CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-Gly-Ser-Ligador-MSLN-hu22A10-vH-Myc-CD8TM-BBz	SKOV3 (2+)	
MSLN	9387	CD8SP-MSLN-7D9-v3-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	SKOV3 (3+)	
MSLN	9389	CD8SP-MSLN-7D9-v3-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-MSLN-7D9-v3-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	SKOV3 (2+)	
MSLN	9398	CD8SP-MSLN-7D9-v3-vL-[hTCRb-KAC-ECD-Bam-CD3zECDTMCP-opt]-F-P2A-SP-MSLN-7D9-v3-vH-[hTCRa-CSDVP-ECD-Kpn-CD3zECDTMCP-opt2]	SKOV3 (+)	
MSLN	9439	CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-PG4SP-v2-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-MSLN-hu22A10-vH-PG4SP-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SKOV3 (2+)	SKOV3 (+)
MSLN	9447	CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-[hTCRb-KAC-ECD-Bam-CD3zECDTMCP-opt]-F-P2A-SP-MSLN-hu22A10-vH-[hTCRa-CSDVP-ECD-Kpn-CD3zECDTMCP-opt2]	SKOV3 (+)	
MSLN	9419	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-Gly-Ser-Ligador-MSLN-hu22A10-vH-Myc4-[preTCRa-Del48]-F-F2A-PAC	SKOV3 (+/-)	SKOV3 (+)
MSLN	2898	CD8SP-MSLN76923-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-MSLN76923-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-PAC		SKOV3 (+/-)
MSLN	9369	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-MSLN-7D9-v3-vL-Gly-Ser-Ligador-MSLN-7D9-v3-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SKOV3 (+)	SKOV3 (+)
Muc17	3045	CD8SP-Muc17-11-CN-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-Muc17-11-CN-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	SKOV3 (+)	
SLC34A2	3581	CD8SP-huMX35-LH4-vL-Gly-Ser-Ligador-huMX35-LH4-vH-Myc-CD8TM-BBz	OVCAR3 (3+)	
Nectin-4	3092	CD8SP-Nectin4-66-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	MDAMB231 (+/-), MCF7 (2+)	MDAMB231 (+), MCF7 (+)

PRLR	3143	CD8SP-PRLR-CN-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-PRLR-CN-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	MCF7 (+)	
PRLR	3191	CD8SP-PRLR-USC2-HL-V4-vL-Gly-Ser-Ligador-PRLR-USC2-HL-V4-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	MCF7 (2+)	MCF7 (+/-)
PRLR	3140	CD8SP-PRLR-CN-vL-Gly-Ser-Ligador-PRLR-CN-vH-Myc-CD8TM-BBz	MCF7 (2+)	
PSMA	3241	CD8SP-hu106mPSMA-4-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-hu106mPSMA-4-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC		PC3 (+), LNCAP (+)
PSMA	3290	CD8SP-PSMA-76-HL-AM-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-PSMA-76-HL-AM-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	PC3 (+/-)	
PSMA	3239	CD8SP-hu106mPSMA-4-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	PC3 (+/-)	
PSMA	3337	CD8SP-PSMA-83A12-HL-AM-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	PC3 (+/-)	
RNF43	3386	CD8SP-RNF43-USC1-HL4-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	LoVo (+/-)	LoVo (+/-)
ROR1	9516	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-ROR1-DART4-vL-Gly-Ser-Ligador-ROR1-DART4-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC		Jeko1 (+)
STEAP	3534	CD8SP-STEAP1-USC1-HL4-vL-Gly-Ser-Ligador-STEAP1-USC1-HL4-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	PC3 (+) LNCAP (+/-)	
STEAP	9565	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-STEAP1-hu120-vL-Gly-Ser-Ligador-STEAP1-hu120-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC		PC3 (+) LNCAP (+)
TSHR	3630	CD8SP-TSHR-hu-3BD10-vL-Gly-Ser-Ligador-TSHR-hu-3BD10-vH-Myc-CD8TM-BBz		MOLM13 (1.5+)
UISP1	3924	CD8SP-hu-UISP1-USC2-LH4-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-UISP1-USC2-LH4-vH-Myc-CD8TM-BBz	MDAMB231 (+/-)	
UPK1B	3730	CD8SP-hUPK1B-USC2-LH4-vL-Gly-Ser-Ligador-hUPK1B-USC2-LH4-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	OVCAR3 (2+) Sudhl1 (+)	
UPK1B	3681	CD8SP-hUPK1B-USC1-LH4-vL-Gly-Ser-Ligador-hUPK1B-USC1-LH4-vH-Myc-CD8TM-z-P2A-K13-FLAG-T2A-PAC	Sudhl1-1(+)	
UPK1B	3682	CD8SP-hUPK1B-USC1-LH4-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-hUPK1B-USC1-LH4-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	OVCAR3 (2+) Sudhl1 (+)	OVCAR (2+), Sudhl1 (1.5+)
VISTA	3780	CD8SP-huVISTA-JJ-USC2-v4-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-huVISTA-JJ-USC2-v4-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	KG1 (+/-) MOLM13 (+/-) HL60 (+/-)	

VISTA	3826	CD8SP-huVISTA-USC1-v4-vL-Gly-Ser-Ligador-huVISTA-USC1-v4-vH-Myc-CD8TM-BBz		MOLM13(+)
BCMA	12755	CD8SP-BCMA-Am06-HL-Mlu-MYC-CD8TM-BBZ-XS-T2A-Pac	L363(+), U266 (+)	
BCMA	12894	CD8SP-BCMA-huC13-F12-vL-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-huC13-F12-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	L363(2+), U266 (2+)	
BCMA	546	CD8SP-BCMA-BB-CAR02-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-BCMA-BB-CAR02-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-PAC	L363(2+), U266 (+)	
BCMA	497	CD8SP-BCMA-Am14-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-BCMA-Am14-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-PAC	L363(2+), U266 (+)	
BCMA	12921	BCMA-huC13-F12vL-Myc2-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-BCMA-huC13-F12vH-MYC4-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	L363(+), U266 (+)	L363(+), U266 (+)
BCMA	449	CD8SP-BCMA-Am08-HL-vL-PG4SP-v2-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-Am08-HL-vH-PG4SP-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	L363(+), U266 (+)	
BCMA	16316	CD8SP-BCMA-huC13-F12-BBz	L363(2+), U266 (+)	L363 (+), U266 (+). Raji(+), Nalm6 (+)
BCMA	13028	CD8SP-BCMA-J6M0-vL-[hTCRβ-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-J6M0-vH-Mlu-huTCRα-CSDVP	L363(+/-)	
BCMA	12922	CD8SP-BCMA-huC13-F12-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-huC13-F12-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	L363(+), U266 (+)	L363(+), U266 (+)
BCMA	12944	CD8SP-BCMA-huC13-F12-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-BCMA-huC13-F12-vH-[hTCRa-T48C]-F-F2A-K13-opt	L363(3+), U266 (3+)	
BCMA		BCMA-HuC12A3-L3H3-BBZ	L363(1.5+), U266 (+)	L363 (+), U266 (+). Raji(+), Nalm6 (+)
BCMA	12890	CD8SP-BCMA-huC12A3-L3H3-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-BCMA-huC12A3-L3H3-vH-[hTCRa-T48C]		L363 (+), U266 (+). Raji(+), Nalm6 (+)
BCMA	12943	CD8SP-BCMA-huC13-F12-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-BCMA-huC13-F12-vH-[hTCRa-T48C]		L363 (+), U266 (+). Raji(+), Nalm6 (+)
BCMA	13102	CD8SP-BCMA-mJ22-9-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-BCMA-mJ22-9-vH-[hTCRa-T48C]	L363 (+), U266 (+). Raji(+), Nalm6 (+/-), Daudi (+)	L363 (+), U266 (+)

BCMA	12996	CD8SP-BCMA-huJ22-10-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-BCMA-huJ22-10-vH-[hTCRa-T48C]	L363 (+), U266 (+). Raji(+), Nalm6 (+/-), Daudi (+)	L363 (+), U266 (+)
BCMA	12807	CD8SP-BCMA-hu72-vL-Gly-Ser-Ligador-BCMA-hu72-vH-Myc-CD8TM-BBz	RAJI (2.5+), L363 (2.5+), U266 (3+)	
BCMA	12837	CD8SP-BCMA-hu72-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-BCMA-hu72-vH-[hTCRa-T48C]	RAJI (3+), L363 (4+), U266 (4+)	
BCMA	12839	CD8SP-BCMA-hu72-vL-[hTCRa-T48C]-F-P2A-SP-BCMA-hu72-vH-[hTCRa-S57C]	RAJI (3+), L363 (4+), U266 (2.5+)	
CD19	895	CD8SP-hu-CAT18-1-HL-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-hu-CAT18-1-HL-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	RAJI (2+), Nalm6 (2+)	RAJI (+), Nalm6 (+)
CD19	846	CD8SP-hCD19-CAT17-HL-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-hCD19-CAT17-HL-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	RAJI (2+), Nalm6 (2+)	RAJI (+), Nalm6 (+)
CD19	16328	CD8SP-huCD19-mROO5-1-(vL-vH)-CD3e-ECDTMCP-opt2-T2A-PAC	RAJI (2+), NALM6 (2+)	
CD19	16239	CD8SP-huCD19-mROO5-1-(vL-vH)-CD3d-ECDTMCP-opt2-T2A-PAC	RAJI (+), NALM6 (+)	
CD19	16317	CD8SP-CD19-hu-mROO5-1-Mlu-CD8TM-BBZ	RAJI (1.5+), NALM6 (1.5+)	RAJI (+), Nalm 6(+)
CD19	14057	CD8SP-huCD19-mROO5-1-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-huCD19-mROO5-1-vH-[hTCRa-T48C]-F-F2A-K13-opt	RAJI(2+), NALM6(4+)	RAJI (+), Nalm6 (+)
CD19	14056	CD8SP-huCD19-mROO5-1-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-huCD19-mROO5-1-vH-[hTCRa-T48C]	RAJI(2+), NALM6(3+)	RAJI (+), Nalm6 (+)
CD19	16318	CD8SP-huCD19-mROO5-1-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-huCD19-mROO5-1-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-K13-opt	RAJI(+), NALM6(2+)	RAJI (+), Nalm 6(+)
CD19	16311	CD8SP-FMC63-BBz		RAJI (+), Nalm 6(+)
CD19	14035	CD8SP-huCD19-mROO5-1-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-huCD19-mROO5-1-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC		RAJI(+), NALM6(+)
CD19	16317	CD8SP-CD19-hu-mROO5-1-Mlu-CD8TM-BBZ		RAJI(+), NALM6(+), Bv173(+), Rec1(+)
CD19	16311	CD8SP-FMC63-BBz		RAJI(+), NALM6(+), Bv173(+), Rec1(+)

CD19	8651	CD8SP-hu-Bu13-vL-Gly-Ser-Ligador-hu-Bu13-vH-Myc-CD8TM-BBz		RAJI(+), NALM6(+), Bv173(+), Rec1(+)
CD19-Nemo		CD8SP-CD19-hu-mROO5-1-Mlu-CD8TM-Asc-hCD3z-xba-P2A-Bam-hNEMO-D23V-K277A		RAJI(+), NALM6(+), Bv173(+), Rec1(+)
CD19-K13	16318	CD8SP-huCD19-mROO5-1-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-huCD19-mROO5-1-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-K13-opt		RAJI(+), NALM6(+)
CD19-MC159L		CD8SP-huCD19-mROO5-1-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-huCD19-mROO5-1-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-MC159		RAJI (+), Nalm6 (+)
CD19	14035	CD8SP-huCD19-mROO5-1-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-huCD19-mROO5-1-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC		RAJI (+), Nalm6 (+)
CD19	16318	CD8SP-CD19-hu-mROO5-1-vL-Xho-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-Bst-CD19-hu-mROO5-1-vH-Mlu-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-Xba-Bam-SynthK13		RAJI (+), Nalm6 (+)
CD19	14109	CD8SP-huCD19-USC3-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-huCD19-USC3-vH-[hTCRa-T48C]	Raji (2.5+), Nalm6 (2.5+), Daudi (2.5+)	
CD22	13284	CD8SP-CD22-h10F4v2-vL-Gly-Ser-Ligador-CD22-h10F4v2-vH-MYC-CD8TM-BBZ-T2A-PA	RAJI (5+), Nalm6 (3+)	
CD22	13293	CD8SP-CD22-h10F4v2-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-CD22-h10F4v2-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	RAJI (6+), Nalm6 (5+)	
CD22	13349	CD8SP-CD22-HA22-vL-[hTCRb-KAC-ECD-Bam-CD3zECDTMCP-opt]-F-P2A-SP-CD22-HA22-vH-[hTCRa-CSDVP-ECD-Kpn-CD3zECDTMCP-opt2]	RAJI (2+), Nalm6 (+/-)	
CD22	13314	CD8SP-CD22-h10F4v2-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-CD22-h10F4v2-vH-[hTCRa-T48C]	RAJI (4.5+), Nalm6 (+/-)	
CD22	13320	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-CD22-HA22-vL-Gly-Ser-Ligador-CD22-HA22-vH-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	RAJI (+)	
CD22	13321	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-CD22-HA22-vL-Gly-Ser-Ligador-CD22-HA22-vH-Myc4-[preTCRa-Del48]-F-F2A-PAC	RAJI (+/-)	
CD22		CD8SP-SC22-HA22-Mlu-CD8TM-BBZ		RAJI(+), Nalm6 (+)
CD22	13346	CD8SP-CD22-HA22-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-CD22-HA22-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC		RAJI(+), Nalm6 (+)

CD22	13369	CD8SP-CD22-HA22-vL-[hTCRa-T48C]-F-P2A-SP-CD22-HA22-vH-[hTCRa-S57C]		RAJI(+), Daudi (+)
CD22		CD22-h10F4v2-Mlu-CD8TM-BBZ		RAJI(+), Daudi (+)
CD22	13316	CD8SP-CD22-h10F4v2-vL-[hTCRa-T48C]-F-P2A-SP-CD22-h10F4v2-vH-[hTCRa-S57C]		RAJI(+), Daudi (+)
CD22	14215	CD8SP-hu-RFB4-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-hu-RFB4-vH-[hTCRa-T48C]	Raji (1.5+), Nalm6 (+), Daudi (2+)	Raji (+)
CD22	13343	CD8SP-CD22-INO-vL-Gly-Ser-Ligador-CD22-INO-vH-Myc-CD8TM-BBz		Raji (+)
CD22	16319	CD8SP-CD22-INO-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-CD22-INO-vH-[hTCRa-T48C]-F-F2A-PAC	Raji (+), Nalm6 (+), Daudi (+)	
CD22	16320	CD8SP-CD22-hu-HA22-2-vL-[hTCRa-T48C]-F-P2A-SP-CD22-hu-HA22-2-vH-[hTCRa-S57C]-F-F2A-Pac	Raji (2+), Nalm6 (+), Daudi (2.5+)	
CD22	16321	CD8SP-CD22-Med-12C5-HL-vH-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-CD22-Med-12C5-HL-vL-[hTCRa-T48C]-F-F2A-PAC	Raji (+), Nalm6 (+/-), Daudi (1.5+)	
CD22	16322	CD8SP-huRFB4-vL-Xho-[hTCRβ-S57C]-F-P2A-SP-Bst-huRFB4-vH-Mlu-[hTCRα-T48C-opt]-F-F2A-Xba-PAC	RAJI (2+), NALM6 (+), Daudi (3+)	
CD22	16323	CD8SP-CD22-CELL7-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-CD22-CELL7-vH-[hTCRa-T48C]-F-F2A-PAC	RAJI (+/-)	
CD22	16324	CD8SP-CD22-HA22-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-CD22-HA22-vH-[hTCRa-T48C]-F-F2A-PAC	RAJI (+), NALM6 (+/-), Daudi (1.5+)	
CLDN6	1526	CD8SP-CLDN6-USC2-LH4-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-CLDN6-USC2-LH4-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	HepG2(3+), OVCAR3 (+)	
DLL3	1622	CD8SP-DLL3-AM14-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	LAN5 (+), SKMEL 37 (+/-)	
Her3	2506	CD8SP-Her3-USC1-HL4-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-Her3-USC1-HL4-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	MCF7(2+)	
MPL		CD8SP-MPL-161-(vL-vH)-Mlu-CD8TM-BBZ-ter-Sal-WPRE-G02		HEL (+)
MPL	16315	CD8SP-MPL-hu-161-2-BBz	HEL (+)	HEL (+)
MPL	13764	CD8SP-hu-161-2-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-hu-161-2-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC		HEL (+)
MPL	13791	CD8SP-hu-161-2-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-hu-161-2-vH-[hTCRa-T48C]	HEL (3+)	HEL (+)
MPL		CD8SP-161-vL-[hTCRb-S57C]-F-P2A-IgHSP-Bst-161-vH-[hTCRa-T48C-opt]-		HEL (+)

MSLN	2749	CD8SP-MSLN-3-HL-AM-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	SKOV3 (+)	
MSLN	2847	CD8SP-MSLN-237-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-vL-Myc-CD8TM-BBz	SKOV3 (+)	
MSLN	9444	CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-MSLN-hu22A10-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SKOV3 (+)	SKOV3 (+)
MSLN	9395	CD8SP-MSLN-7D9-v3-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-MSLN-7D9-v3-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SKOV3 (+)	SKOV3 (+)
MSLN	14321	CD8SP-MSLN-7D9-HL-vH-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-MSLN-7D9-HL-vL-[hTCRa-T48C]	SKOV3 (+/-)	SKOV3 (+)
MSLN		CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-Xho-[hTCRβ-KACIAH]-F-P2A-SP-Bst-MSLN-hu22A10-vH-Mlu-[hTCRα-CSDVP]-F-F2A-Xba-Bam-SynthK13	SKOV3 (+)	SKOV3 (+)
MSLN		CD8SP-MSLN-7D9-vH-Xho-[hTCRβ-KACIAH]-F-P2A-SP-Bst-MSLN-7D9-vL-Mlu-[hTCRα-CSDVP]-F-F2A-Xba-Bam-SynthK13	SKOV3 (+)	SKOV3 (+)
MSLN	14294	CD8SP-MSLN-7D9-HL-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-MSLN-7D9-HL-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	SKOV3 (+/-)	SKOV3 (+)
MSLN	14241	CD8SP-MSLN-5-HL-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-MSLN-5-HL-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	SKOV3 (+)	SKOV3 (+)
MSLN		CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-Xho-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-IgHSP-Bst-MSLN-hu22A10-vH-Mlu-[hTCRb-KACIAH]-		SKOV3 (+)
MSLN	2847	MSLN-237-BBZ		SKOV3 (+)
MSLN	16312	CD8SP-MSLN-hu22A10-BBz	SKOV-3 +/-	SKOV3 (+)
MSLN	16313	CD8SP-MSLN-7D9-HL-BBz	SKOV-3 +/-	SKOV3 (+)
MSLN	16314	CD8SP-MSLN-5-HL-BBz	SKOV-3 +	SKOV3 (+)
MSLN	2849	CD8SP-MSLN-237-HL-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-MSLN-237-HL-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC		SKOV3 (+)
MSLN	14348	CD8SP-MSLN-hu22A10-vL-PG4SP-v2-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-MSLN-hu22A10-vH-PG4SP-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SKOV-3 +/-	
MSLN	14295	CD8SP-MSLN-7D9-HL-vH-PG4SP-v2-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-MSLN-7D9-HL-vL-PG4SP-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SKOV-3 +	
MSLN	14268	CD8SP-MSLN-5-HL-vH-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-MSLN-5-HL-vL-[hTCRa-T48C]	SKOV-3 +	SKOV3 (+)

MSLN	14274	CD8SP-V5-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-CD8SP-MSLN-7D9-HL-vH-Gly-Ser-Ligador-MSLN-7D9-HL-vL-Myc-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC	SKOV-3 +	
SLC34A2	3584	CD8SP-huMX35-LH4-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-huMX35-LH4-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC	OVCAR3 (3+)	

Análisis comparativo de CD19 CAR con diferentes dominios de unión a antígeno

Las células T se infectan con CAR que contienen diferentes dominios de unión a antígenos pero que tienen una estructura similar. Células T que expresan los CAR en el esqueleto CAR de segunda generación (por ejemplo, SEQ ID NO: 16317) y el esqueleto SIR de doble cadena (por ejemplo, SEQ ID NO: 14056 y 14109) y que contienen los dominios de unión al antígeno (por ejemplo, Fragmentos vL y vH, vL-CDR1-3 y vH-CDR-1-3) derivados de huCD19-mROO5-1 (SEQ ID NO: 14406 y 14437) y huCD19-USC3 (SEQ ID NO: 14400 y 14431), respectivamente, muestran resultados superiores in vitro citotoxicidad y secreción de citocinas en comparación con las células T que expresan el CAR correspondiente que contiene los dominios de unión al antígeno (por ejemplo, fragmentos vL y vH) derivados de hu-CD19-USC1-LH4 (SEQ ID NO: 4190 y 4264), CD19-9B7 (SEQ ID NO: 4151 y 4225) y hu-Bu-13 (SEQ ID NO: 9655 y 9686). Por lo tanto, los dominios de unión a antígeno derivados de hu-CD19-USC1-LH4, CD19-9B7 y hu-Bu-13 no se seleccionaron para la construcción de CAR (por ejemplo, CAR de segunda generación, SIR, Ab-TCR, TFP, etc.)

Estudios in vitro e in vivo con células CAR-T CD19

Se aislaron células T de sangre periférica humana usando perlas magnéticas CD3 y se infectaron con lentivirus que expresaban las construcciones CAR (SEQ ID NO: 16311, 16317 y 16318) dirigidas a CD19. Las secuencias de aminoácidos de estos CAR están representadas por SEQ ID NO: 16335, 16341 y 16342, respectivamente. El CAR representado por SEQ ID NO: 16311 es un CAR de segunda generación con dominio de unión a antígeno derivado del anticuerpo FMC63 y contiene un dominio coestimulador 41BB y un dominio de activación CD3z. El CAR representado por SEQ ID NO: 16317 es un CAR de segunda generación con dominio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo anti-CD19 humanizado de baja afinidad y contiene un dominio coestimulador 41BB y un dominio de activación CD3z. En contraste, el CAR representado por SEQ ID NO: 16318 es un SIR de doble cadena que contiene el dominio de unión al antígeno derivado de un anticuerpo anti-CD19 humanizado de baja afinidad. Esta construcción SIR también expresó un módulo accesorio que codifica una versión optimizada de codones de vFLIP-K13 (SEQ ID NO: 12734). Todas las construcciones CAR se clonaron en el vector pCCLc-MNDU3-WPRE (SEQ ID NO: 12639). Las células CAR-T se expandieron in vitro durante 21 días en medio XVIVO complementado con IL2 recombinante y perlas CD3 / CD28. La tinción con Proteína L conjugada con APC seguida de citometría de flujo el día 5 después de la infección reveló una fuerte expresión de las construcciones CAR SEQ ID NO: 16311 y SEQ ID NO: 16317 en la superficie celular con aproximadamente 45-50% de células mostrando tinción de Proteína L. En contraste, se observó muy poca expresión en la superficie celular de CAR representada por SEQ ID NO: 16318 con menos del 2% de células mostrando tinción de superficie con Proteína L. Después de 3 semanas en cultivo, las células RAJI y NALM que expresan de manera estable GLuc se cocultivaron con T células que expresan los diferentes CAR con una relación Efecto: objetivo (E: T) de 1: 1 durante

48 horas. Se recogió el sobrenadante y se utilizó para medir IFN γ mediante ELISA. La Figura 2A muestra un aumento significativo en la producción de IFN γ cuando todas las células CAR-T se cultivan conjuntamente con células RAJI que expresan un alto nivel de CD19. La Figura 2B muestra que CAR-T que expresa el constructo SEQ ID NO: 16318 muestra una mayor inducción de IFN γ en comparación con CAR-T que expresa el constructo SEQ ID NO: 16311 cuando se cocultiva con células Nalm6 que expresan niveles modestos de CD19. Se obtuvieron resultados esencialmente similares cuando se repitió el experimento para medir la producción de TNF α . Para probar la eficacia in vivo de las diferentes células CAR-T, se inyectaron ratones NSG a través de la vena de la cola con $0,5 \times 10^6$ células RAJI que expresan de manera estable luciferasa de luciérnaga (RAJI-Luc) y tres días después se inyectaron 4×10^6 células T que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 16311, 16317 y 16318). Se obtuvieron imágenes de los animales semanalmente mediante imágenes de bioluminiscencia después de la inyección de D-luciferina. La Figura 3 muestra que hubo un crecimiento tumoral significativo en animales que no recibieron células T o células T de control y todos murieron el día 23. Los animales que recibieron células T que expresan SEQ ID NO: 16311 y 16317 inicialmente eliminaron la enfermedad pero mostraron una recaída de la enfermedad después del día 28. Por el contrario, los animales que recibieron células T que expresaban CAR con SEQ ID NO: 16318 permaneció libre de enfermedad hasta el día 51. Ratones que recibieron células T que expresaban CAR con SEQ ID NO: 16318 tuvo una supervivencia mejorada en comparación con los ratones que no recibieron células T, células T de control o células T que expresan SEQ ID NO: 16311. Los ratones que recibieron células T que expresan SEQ ID NO: 16317 tuvieron una supervivencia intermedia.

Estudios in vitro e in vivo con células CAR-T CD19

Se aislaron células T de sangre periférica humana usando perlas magnéticas CD3 y se infectaron con lentivirus que expresaban las construcciones CAR (SEQ ID NO: 16311 y 14056) dirigidas a CD19. Se ha descrito el CAR representado por SEQ ID NO: 16311. En contraste, el CAR representado por SEQ ID NO: 14056 es un SIR de cadena doble que contiene el dominio de unión al antígeno derivado de un anticuerpo humanizado de baja afinidad. La secuencia de aminoácidos de esta construcción está representada por SEQ ID NO: 15800. Ambas construcciones CAR se clonaron en el vector pCCLc-MNDU3-WPRE (SEQ ID NO: 12639). La secuencia de ácido nucleico del vector pCCLc-MNDU3-WPRE que codifica el CAR con la SEC ID NO: 14056 está representada por la SEC ID NO: 12641. Las células CAR-T se expandieron in vitro. La tinción con proteína L conjugada con APC seguida de citometría de flujo el día 6 después de la infección reveló una fuerte expresión de las construcciones CAR SEQ ID NO: 16311 en la superficie celular con aproximadamente 71.07% de células mostrando tinción con proteína L. Por el contrario, se observó una menor expresión de CAR en la superficie celular representada por la SEC ID NO: 14056 con un 22.04% de células mostrando tinción en la superficie con Proteína L. Después de aproximadamente 1 semana de expansión, las células RAJI y NALM que expresan GLuc de manera estable se cocultivaron con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 1: 1 durante 48 horas. Se recogió el sobrenadante y se utilizó para medir IFN γ , TNF α e IL2 mediante ELISA. Las células T que expresan el CAR de próxima generación (es decir, SIR de doble cadena) representado por SEQ ID NO: 14056 mostraron una producción robusta de IFN γ , TNF α e IL2 cuando se cultivaron conjuntamente con células RAJI mientras que las células T que expresan FMC63-BBz CAR (SEQ ID NO: 16311) mostró una inducción débil de estas citocinas. El

experimento se repitió después de 4 semanas de expansión de células CAR-T en cultivo en medio XVIVO en presencia de anticuerpos IL2 y CD3 y CD28. Se observó que las células T que expresan el CAR representado por SEQ ID NO: 14056 continúan mostrando una producción robusta de IFN γ , TNF α e IL2 cuando se cultivan conjuntamente con células RAJI mientras que las células T que expresan FMC63-BBz CAR (SEQ ID NO: 16311) mostraron una inducción de muy baja a insignificante de estas citocinas, lo que sugiere evidencia de agotamiento funcional. Para probar la eficacia in vivo de las diferentes células CAR-T, se inyectaron ratones NSG a través de la vena de la cola con $0,5 \times 10^6$ células NALM6 (leucemia linfocítica aguda de células B) que expresaban de manera estable luciferasa de luciérnaga (NALM6-Luc) y tres días después se inyectaron con 3×10^6 células T que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 16311 y 14056) que se habían expandido in vitro durante 2-3 semanas. Se obtuvieron imágenes de los animales semanalmente mediante imágenes de bioluminiscencia después de la inyección de D-luciferina. La Figura 4 muestra que hubo un crecimiento tumoral significativo en animales que no recibieron células T o células T de control y todos murieron el día 29. Los animales que recibieron células T que expresan SEQ ID NO: 16311 inicialmente eliminaron la enfermedad pero mostraron recaída de la enfermedad después del día 29. Por el contrario, los animales que recibieron células T que expresan CAR con SEQ ID NO: 14056 permanecieron libres de enfermedad hasta el día 36. Los ratones que recibieron células T que expresan CAR con SEQ ID NO: 14056 tuvieron una supervivencia mejorada en comparación con los ratones que no recibieron células T, células T de control o células T que expresan CAR representadas por SEQ ID NO: 16311. Se obtienen resultados esencialmente similares cuando se administran células T que expresan SIR (SEQ ID NO: 16330) a ratones NSG xenoinjertados con células Nalm6.

Comparación del enmascaramiento de antígenos por CAR, SIR y TFP dirigidos a CD19

La inserción accidental de un CAR CD19 convencional de segunda generación en una sola célula B Se demostró recientemente que las células de leucemia linfocítica aguda provocan una recaída de la enfermedad debido al enmascaramiento de CD19 expresado en las células leucémicas por el polipéptido CAR expresado en las células de leucemia (Ruella M et al, Nat Med.2018 Octubre; 24 (10): 1499-1503). Esto impidió que las células CAR-T reconocieran y mataran las células leucémicas que expresaban el CAR, lo que provocó la proliferación clonal, la recaída de la enfermedad y la muerte del paciente. Para probar si los CAR de próxima generación también son susceptibles a este problema, los lentivirus que codifican los CAR de segunda generación (SEQ ID NO: 16311, 16317), SIRs (SEQ ID NO: 14035, 14056, 14065, 14109 y 16330) y TFP (SEQ ID NO: 16328 y 14098) se expresan de forma estable en células RAJI y Nalm6 que expresan CD19. Las células que expresan CAR se tiñen posteriormente con anticuerpo CD19 conjugado con PE (por ejemplo, FMC63-PE). Se observa que la expresión de los CAR de segunda generación (SEQ ID NO: 16311, 16317) y TFP (SEQ ID NO: 16328 y 14098) da como resultado el enmascaramiento de CD19 en las células RAJI y Nalm6, como lo revela la disminución de la tinción de la superficie celular para CD19 determinado por unión con anticuerpo CD19-PE y citometría de flujo. Por el contrario, la expresión de SIR (SEQ ID NO: 14035, 14056, 14065, 14109 y 16330) no tiene un efecto significativo sobre la expresión de CD19 en células RAJI y Nalm6. Además, las células RAJI que expresan los CAR de segunda generación (SEQ ID NO: 16311, 16317) y TFP (SEQ ID NO: 16328 y 14098) muestran una destrucción reducida por las células T que expresan

el CAR y TFP correspondientes, mientras que las células RAJI que expresan los SIR (SEQ ID NO: 14035, 14056, 14065, 14109 y 16330) conservan su susceptibilidad a la muerte por las células T que expresan el SIR correspondiente.

5 **Comparación de CAR mediante el modelo de síndrome de liberación de citocinas (CRS)**

La capacidad de diferentes construcciones de CAR CD19 para inducir CRS se probó utilizando un modelo de ratón descrito recientemente (Giavridis T et al, Nature Medicine, 2018). Brevemente, se inyectaron i.p (intraperitoneal) ratones SCID-Biege con 3 millones de células Raji-pLenti-Luc el día 1. Se inyectaron 30 millones de células T que expresaban CAR (SEQ ID NO: 16315 y 16330) el día 21 (intraperitoneal). De forma similar al estudio publicado (Giavridis T et al, Nature Medicine), un tercio de los animales que recibieron el CAR de 2ª generación (SEQ ID NO: 16315) murieron después de la inyección de células CAR-T. Ninguno de los animales que recibieron SIR (SEQ ID NO: 16330) murió. Esencialmente, se obtienen resultados similares cuando se repite el experimento usando células T que expresan el SIR (SEQ ID NO: 14056).

Análisis comparativo de MPL CAR con diferentes dominios de unión a antígeno

Las células T se infectan con CAR que contienen diferentes dominios de unión a antígenos pero que tienen una estructura similar. Células T que expresan los CAR de MPL en diferentes cadenas principales de CAR (por ejemplo, SEQ ID NO: 16315, 13761-13770, 13780-13794) y que contienen los dominios de unión al antígeno (por ejemplo, Fragmentos vL y vH, vL-CDR1-3 y vH-CDR -1-3) derivados de hu-161-2 (SEQ ID NO: 14409 y 14440) y hu-161-3 (SEQ ID NO: 14402 y 14433), respectivamente, muestran una citotoxicidad y secreción de citoquinas in vitro superiores en comparación con las células T que expresan el CAR correspondiente que contienen los dominios de unión al antígeno (por ejemplo, fragmentos vL y vH) derivados de MPL-178, MPL-12E10 y MPL-AB317 que se describen en el documento WO2019067805. Por lo tanto, los dominios de unión a antígeno derivados de MPL-178, MPL-12E10 y MPL-AB317 no se seleccionaron para la construcción de CAR dirigidas a MPL (por ejemplo, CAR de segunda generación, SIR, Ab-TCR, TFP, etc.). En su lugar, los dominios de unión a antígeno derivados de hu-161-2 (SEQ ID NO: 14409 y 14440) y hu-161-3 (SEQ ID NO: 14402 y 14433) y vL y vH que contienen sus regiones CDR correspondientes se seleccionaron para CAR (por ejemplo, CAR de segunda generación, SIR, Ab-TCR, TFP, etc.) que tienen como objetivo MPL. Se comparan los CAR con SEQ ID NO: 13791 y 13793 y se muestra que CAR con SEQ ID NO: 13791 exhibe una citotoxicidad y producción de citocinas in vitro superiores en comparación con CAR con SEQ ID NO: 13793. También se encuentra que los CAR con SEQ ID NO: 13791 son superiores al CAR correspondiente en el mismo esqueleto pero que contienen el dominio de unión al antígeno derivado de MPL-161 murino como se describe en el documento WO2019067805.

Estudios in vitro e in vivo con células MPL CAR-T Se aislaron células T de sangre periférica humana usando perlas magnéticas CD3 y se infectaron con lentivirus que expresaban las construcciones CAR (SEQ ID NO: 16315 y 13791) dirigidas a MPL humana (receptor de trombopoyetina). El CAR (CD8SP-MPL-hu-161-2-BBz) representado por SEQ ID NO: 16315 es un CAR de segunda generación con dominio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo MPL humanizado y contiene un dominio coestimulador 41BB y un dominio de activación CD3z. Por el contrario, el CAR

representado por SEQ ID NO: 13791 es un SIR de doble cadena que contiene el dominio de unión al antígeno derivado de un anticuerpo MPL humanizado. Ambas construcciones CAR se clonaron en el vector pCCLc-MNDU3-WPRE (SEQ ID NO: 12639). Las células CAR-T se expandieron in vitro durante hasta 2-4 semanas. Las células HEL.92.1.7 que expresan GLuc de manera estable se cocultivaron con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 1: 1 durante 48 horas. La muerte celular se midió usando el ensayo Matador. Los linfocitos T que expresan el CAR de próxima generación (es decir, SIR de doble cadena) representado por SEQ ID NO: 13791 mostraron una fuerte inducción de muerte celular diana y producción de citocinas, mientras que los linfocitos T que expresan MPL-hu-161-2-BBz CAR (SEQ ID NO: 16315) mostró una inducción débil de la muerte de las células diana y la producción de citocinas. Para probar la eficacia in vivo de las diferentes células CAR-T, se inyectaron ratones NSG a través de la vena de la cola con 0.5×10^6 células HEL.92.1.7 (leucemia mieloide aguda) que expresaban de manera estable luciferasa de luciérnaga (HEL-Luc) y tres días después se inyectaron con 3×10^6 células T que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 16315 y 13791) que se habían expandido in vitro durante 2-3 semanas. Ratones que recibieron células T que expresan CAR con SEQ ID NO: 13791 había mejorado la supervivencia en comparación con los ratones que no recibieron células T, células T de control o células T que expresan SEQ ID NO: 16315.

Comparación del enmascaramiento de antígenos por CAR, SIR y TFP dirigidos a MPL

Las células HEL.92.1.7 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 16315, 13780 y 13791) dirigidas a MPL humana. El efecto de la expresión de CAR sobre el enmascaramiento de MPL se determina mediante tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo MPL (1.6.1) y análisis FACS. Alternativamente, la expresión de MPL no unida se determina mediante la unión con una proteína de fusión 161-scFv-Nluc (SEQ ID NO: 2245 como se describe en el documento WO2017173403, que se incorpora aquí en su totalidad como referencia). La proteína de fusión 161-scFv-Nluc contiene el dominio de unión al antígeno derivado de un anticuerpo dirigido a MPL (1.6.1) fusionado a NLuc. Se encuentra que la expresión de CAR con SEQ ID NO: 16315 y 13780 en células HEL.92.1.7 da como resultado un enmascaramiento de antígeno mientras que la expresión de CAR con SEQ ID NO: 13791 no da como resultado un enmascaramiento significativo de MPL.

Análisis comparativo de BCMA CAR con diferentes dominios de unión a antígeno

Las células T se infectan con CAR que contienen diferentes dominios de unión a antígenos pero que tienen una estructura similar. Células T que expresan los CAR de BCMA en diferentes cadenas principales de CAR (por ejemplo, SEQ ID NO: 12913, 12916-12946) y que contienen los dominios de unión al antígeno (por ejemplo, Fragmentos vL y vH, vL-CDR1-3 y vH-CDR-1-3) derivado de BCMA-huC13-F12 (SEQ ID NO: 14413 y 14444), BCMA-huC12A3-L3H3 (SEQ ID NO: 14414 y 14445), BCMA-J6M0 (SEQ ID NO: 14415 y 14446), BCMA-huJ22- 10 (SEQ ID NO: 14398 y 14229) y BCMA-hu72 (SEQ ID NO: 14401 14432) respectivamente, muestran una citotoxicidad y secreción de citocinas in vitro superiores. Por lo tanto, los dominios de unión al antígeno derivados de los dominios de unión al antígeno anteriores y vL y vH que contienen sus regiones CDR correspondientes se seleccionaron para los CAR dirigidos a BCMA (por ejemplo, CAR de segunda generación, SIR, Ab-TCR, TFP, etc.).

Estudios in vitro e in vivo con células BCMA CAR-T

Se infectaron células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 con lentivirus que expresaban las construcciones CAR (SEQ ID NO (ADN): 16316 y 12890, 12943) dirigidas

a BCMA humano. Las secuencias de aminoácidos correspondientes de estas construcciones están representadas por SEQ ID NO: 16340, 14634 y 14687). El CAR representado por SEQ ID NO: 16316 es un CAR de segunda generación con dominio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo MPL humanizado y contiene un dominio coestimulador 41BB y un dominio de activación CD3z. En contraste, el CAR representado por SEQ ID NO: 12890 y 12943 son SIR de doble cadena. Ambas construcciones CAR se clonaron en el vector pCCLc-MNDU3-WPRE (SEQ ID NO: 12639). La secuencia completa de ácido nucleico del vector lentivírico que codifica los CARs SEQ ID NO: 12890 y 12943 está representada por SEQ ID NO: 14378-14385, respectivamente. Las células CAR-T se expandieron in vitro durante hasta 2-4 semanas. Las células L363 que expresan GLuc de forma estable se cocultivaron con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 1: 1 durante 48 horas. La muerte celular se midió usando el ensayo Matador. Todas las células CAR-T mostraron una modesta inducción de muerte de la célula diana y producción de citocinas (IFN γ y TNF α). Para probar la eficacia in vivo de las diferentes células CAR-T, se inyectaron ratones NSG a través de la vena de la cola con $0,5 \times 10^6$ L363 (leucemia de células plasmáticas) que expresaba de manera estable luciferasa de luciérnaga (L363-Luc) y dos días después se inyectaron 2×10^6 células T que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 16316 y 12890, 12943) que se habían expandido in vitro durante 2-3 semanas. Los ratones que recibieron células T que expresan CAR con SEQ ID NO: 16316 y 12890, 12943 tuvieron una supervivencia mejorada en comparación con los ratones que recibieron células T de control. Se obtienen resultados esencialmente similares utilizando células T que expresan los CAR representados por las SEQ ID NO: 13049, 12996 y 12837.

La capacidad de diferentes construcciones CAR para enmascarar el antígeno BCMA se prueba expresando de manera estable las construcciones CAR con SEQ ID NO (ADN): 16316 y 12890, 12943 en líneas celulares L363 y U266. Se observa que la expresión estable de CAR 16316 da como resultado un enmascaramiento de antígeno de BCMA mientras que no se observa ningún enmascaramiento de antígeno significativo tras la expresión estable de construcciones con SEQ ID NO: 12890, 12943. De manera similar, CAR con SEQ ID NO: 13049, 12996 y 12837 no dan como resultado un enmascaramiento del antígeno cuando se expresan en células L363 o U266 que expresan BCMA.

Análisis comparativo de CAR de mesotelina (MSLN) con diferentes dominios de unión a antígeno

Las células T se infectan con CAR que contienen diferentes dominios de unión a antígenos pero que tienen una estructura similar. Células T que expresan los CAR de MSLN en diferentes cadenas principales de CAR (por ejemplo, SEQ ID NO: 14291-14323) y que contienen los dominios de unión al antígeno (por ejemplo, Fragmentos vL y vH, vL-CDR1-3 y vH-CDR-1-3) derivados de MSLN-3-HL-AM (SEQ ID NO: 4136 y 4210), MSLN-5 (SEQ ID NO: 14412 y 14443), MSLN-7D9-HL (SEQ ID NO: 14411 y 14442) y MSLN-hu22A10 (SEQ ID NO: 14410 y 14441) respectivamente, muestran citotoxicidad y secreción de citocinas in vitro superiores en comparación con los domains de unión a antígeno derivados de MSLN-HuAM15 y MSLN76923-HL. Por lo tanto, los dominios de unión a antígeno derivan de MSLN-3-HL-AM (SEQ ID NO: 4136 y 4210), MSLN-5 (SEQ ID NO: 14412 y 14443), MSLN-7D9-HL (SEQ ID NO: 14411 y 14442), y MSLN-hu22A10 (SEQ ID NO: 14410 y 14441) y vL y vH que contienen sus regiones CDR correspondientes se seleccionaron para los CAR dirigidos a MSLN (por ejemplo, CAR de segunda generación, SIR, Ab-TCR, TFP, etc.).

Análisis comparativo de CAR de mesotelina (MSLN) con diferentes dominios y cadenas principales de unión a antígeno

Se generaron células T que expresan los CAR de MSLN que contienen diferentes dominios de unión al antígeno y en diferentes cadenas principales de CAR (SEC ID NO: 16312-16314; 16361-16363) usando transferencia génica que involucra el vector pCCLc-MNDU3-WPRE (SEC ID NO: 12639). Las células T que expresan CAR se probaron frente a células SKOV3 para determinar su citotoxicidad usando el ensayo Matador y para determinar la producción de citocinas. Todas las células CAR-T mostraron citotoxicidad de leve a moderada y niveles variables de producción de citocinas en el cocultivo con células SKOV3. A continuación, se probaron las células CAR-T en un modelo de xenoinjerto SKOV3 en ratones NSG. Para este propósito, se inyectaron subcutáneamente 1×10^6 células SKOV3-Luc y una semana después se inyectó una inyección intravenosa de 3×10^6 células T que expresan CAR. El crecimiento del tumor se controló mediante formación de imágenes de bioluminiscencia y medición del volumen del tumor. Se observó una inhibición de leve a modesta del crecimiento tumoral en ratones que recibieron células T que expresan CAR con SEQ ID NO: 16312-16314 y 16361-16362.

A continuación, se generaron células T que expresan los CAR de MSLN que contienen diferentes dominios de unión a antígenos y en diferentes cadenas principales de CAR (SEQ ID NO: 16313-16314; 16331-16334; 14268-14269; 14321 y 14374) usando transferencia génica que involucra pCCLc -MNDU3-WPRE vector (SEQ ID NO: 12639). La secuencia de aminoácidos de estas construcciones CAR está representada por SEQ ID NO: 16337-16338; 16354-16357; 16012-16013, 16065 y 16118, respectivamente. La secuencia completa de ácido nucleico del vector lentivírico que codifica los CARs SEQ ID NO: 14374, 14321 y 14268 está representada por SEQ ID NO: 14381-14383, respectivamente. Las células T que expresan CAR se probaron frente a células SKOV3 para determinar su citotoxicidad usando el ensayo Matador y para determinar la producción de citocinas. Todas las células CAR-T mostraron una citotoxicidad moderada y niveles variables de producción de citocinas después de un cocultivo de 72 horas con células SKOV3 en una relación E: T de 1: 1. Los linfocitos T que expresan los CAR mostraron una alta producción basal de IFN γ y TNF α que estaba ausente en los linfocitos T que expresan los CAR 16331-16334; 14268-14269; 14321 y 14374. A continuación, las células CAR-T se probaron en un modelo de xenoinjerto SKOV3 en ratones NSG. Para este propósito, se inyectaron subcutáneamente 1×10^6 células SKOV3-Luc y una semana después se inyectó una inyección intravenosa de 3×10^6 células T que expresan CAR. El crecimiento del tumor se controló mediante formación de imágenes de bioluminiscencia y medición del volumen del tumor. Mientras que los ratones a los que se les administraron células T que expresaban CAR con la SEC ID NO: 16313-16314 no pudieron controlar el tumor, los ratones que recibieron CAR con la SEC ID NO: 16331-16334; 14268-14269; 14321 y 14374 erradicaron completamente el tumor después del día 18 y no se observó ningún tumor medible en estos animales hasta el día 67. Los resultados se confirmaron usando imágenes de bioluminiscencia. Esto dio como resultado una mejora significativa en la supervivencia en animales a los que se les dio CAR con SEQ ID NO: 16331-16334; 14268-14269; 14321 y 14374.

Análisis comparativo de CAR CD22 con diferentes dominios de unión a antígeno

Las células T se infectan con CAR que contienen diferentes dominios de unión a antígenos pero que tienen una estructura similar. Células T que expresan los CAR CD22 en el esqueleto CAR de segunda

generación (por ejemplo, SEQ ID NO: 13443, 13390, 13284 y 14185) y esqueleto SIR de doble cadena (por ejemplo, SEQ ID NO: 13473, 13420, 13314 y 14215) y que contienen el antígeno dominios de unión (por ejemplo, fragmentos vL y vH, vL-CDR1-3 y vH-CDR-1-3) derivados de CD22-INO (SEQ ID NO: 14387 y 14418), CD22-hu-HA22-2 (SEQ ID NO : 14399 y 14430) CD22-h10F4v2 (SEQ ID NO: 14407 y 14438) y CD22-hu-RFB4 (SEQ ID NO: 14396 y 14427), respectivamente, muestran citotoxicidad in vitro y secreción de citoquinas superiores en comparación con las células T que expresan el CAR correspondiente que contiene los dominios de unión al antígeno (por ejemplo, fragmentos vL y vH) derivados de hu-HA22-1 (SEQ ID NO: 4123 y 4197) y CD22-CELL7 (SEQ ID NO: 14390 y 14421). Por lo tanto, los dominios de unión a antígenos derivados de hu-HA22-1 y CD22-CELL7 no se seleccionaron para la construcción de CAR dirigidas a CD22 (por ejemplo, CAR de segunda generación, SIR, Ab-TCR, TFP, etc.). En cambio, los dominios de unión a antígeno que se derivan de CD22-INO (SEQ ID NO: 14387 y 14418), CD22-hu-HA22-2 (SEQ ID NO: 14399 y 14430) CD22-h10F4v2 (SEQ ID NO: 14407 y 14438) y CD22-hu-RFB4 (SEQ ID NO: 14396 y 14427) y vL y vH que contienen sus regiones CDR correspondientes se seleccionaron para los CAR dirigidos a CD22.

Las células T que expresan el receptor de folato 1 (FR1 o FOLR1) CAR inducen citotoxicidad en células SKOV3 que expresan FR1. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 estaban infectado con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 2062-2102; 2111-2140) dirigidas a FR1. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células SKOV3 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR de BAFF-R inducen citotoxicidad en células Jeko-1 y REC-1 que expresan BAFF-R. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (por ejemplo, SEQ ID NO: 13922-13953; 13848-13858, 13869-13900, 13954-13964; 13975-14006) dirigidas a BAFF-R. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células Jeko-1 y REC-1 que expresan de forma estable hGLuc se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La producción de IFN γ y TNF α se determina mediante ELISA. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto Jeko-1 en ratones NSG. Se muestra que las células T que expresan los CAR (por ejemplo, SEQ ID NO: 13897, 13950, 14003, etc.) activan la señalización de las células T cuando se encuentran con células BAFF-R positivas.

Las células T que expresan CAR de mesotelina (MSLN) inducen citotoxicidad en células SKOV3 que expresan MSLN. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 2748-2777; 2797-2826; 2846-2875; 2895-2924; 2944-2973; 9386-9415; 9435- 9464) dirigido a MSLN. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células SKOV3 que expresan hGLuc

de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

5 **Las células T que expresan CAR de Her2 inducen citotoxicidad en células MCF7 que**

expresan Her2. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 2346, 2356-2385; 2395, 2405-2434; 2444, 2454-2483; 9092-9121; 9141-9170) dirigidas a Her2. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células MCF7 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

15 **Las células T que expresan CAR de EGFRviii inducen citotoxicidad en células U87MG**

que expresan EGFRviii. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 1660, 1670-1699, 1709, 1719-1748, 1758, 1768-1797, 1807, 1817-1846) dirigidas a EGFRviii. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células U87MG-EGFRviii que expresan GLuc de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

25 **Las células T que expresan EMR2 CAR inducen citotoxicidad en células que**

expresan EMR2. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 1856, 1866-1895, 1905, 1915-1944, 1954, 1964-1993) dirigidas a EMR2. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células Molm13 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

35 **Las células T que expresan EMR2 CAR inducen citotoxicidad en células que**

expresan EMR2. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 1856, 1866-1895, 1905, 1915-1944, 1954, 1964-1993) dirigidas a EMR2. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células Molm13 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

40

Las células T que expresan CAR CD19 inducen citotoxicidad en células que expresan

CD19. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 769-817, 720-768, 867-915, 965-1013, 818-866, 8632-8680) dirigidas a CD19. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células RAJI o NALM6 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 4 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG

Las células T que expresan CAR CD20 inducen citotoxicidad en células que expresan CD20.

Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 1063-1111, 1014-1062) dirigidas a CD20. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células RAJI o NALM6 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 4 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan BCMA CAR inducen citotoxicidad en células que expresan BCMA.

Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 377-572, 8093-8484) que se dirigen a BCMA. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células U266 y L363 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan FLT3 CARs inducen citotoxicidad en células que expresan FLT3.

Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 8926-9023) dirigidas a FLT3. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células RS4; 11 y MV4; 11 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CLL1 CAR inducen citotoxicidad en células que expresan

CLL1. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 8779-8876) dirigidas a CLL1. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células RAJI y U937 que expresan GLuc de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR de BST1 inducen citotoxicidad en células que expresan BST1. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 8485-8631) dirigidas a BST1. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células KG1 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan IL1RAP CARs inducen citotoxicidad en células que expresan IL1RAP. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 9171-9317) dirigidas a IL1RAP. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células THP-1 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan las CAR de gpA33 inducen citotoxicidad en las células que expresan gpA33. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 9024-9072) dirigidas a gpA33. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células Molm-13 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CLDN6 CAR inducen citotoxicidad en células que expresan CLDN6. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 1455-1552) dirigidas a CLDN6. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células HepG2 que expresan GLuc de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan UPK1B CAR inducen citotoxicidad en células que expresan UPK1B. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 1455-1552) dirigidas a UPK1B. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células OVCAR-3 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR de BMPR1B inducen citotoxicidad en células que expresan BMPR1B. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 573-670) dirigidas a BMPR1B. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células LNCaP y COV434 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR de WISP1 inducen citotoxicidad en células que expresan WISP1. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3856-3953) dirigidas a WISP1. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células MDA-MB-453 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR CD133 inducen citotoxicidad en células que expresan CD133. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 11312-11458) dirigidas a CD133. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células Reh y RS4; 11 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR del receptor de prolactina (PRLR) inducen citotoxicidad en células que expresan PRLR. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3121-3218) dirigidas a PRLR. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células MCF7 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR de IL13Ra2 inducen citotoxicidad en células que expresan IL13Ra2. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 14132-14165) dirigidas a IL13Ra2. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células U87MG que expresan GLuc de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR de Nectin-4 inducen citotoxicidad en células que expresan Nectin-4. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3072-3120, 9465-9513) dirigidas a Nectin-4. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células MCF7 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR de PSMA inducen citotoxicidad en células que expresan PSMA. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3219-3365) dirigidas a PSMA. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células PC3 que expresan GLuc de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan TSHR (receptor de hormonas estimulantes de la tiroides) CAR inducen citotoxicidad en células que expresan TSHR. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3611-3659) dirigidas a TSHR. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células TT que expresan GLuc de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR CDH19 inducen citotoxicidad en células que expresan CDH19. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 1308-1405) que se dirigen a CDH19. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células MEL-624 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR de VISTA inducen citotoxicidad en células que expresan VISTA. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3758-3855) dirigidas a VISTA. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células MOLM-13 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 4 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR de ROR1 inducen citotoxicidad en células que expresan ROR1. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 9514-9562) dirigidas a ROR1. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células JEKO-1 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 4 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan Liv1 CARs inducen citotoxicidad en células que expresan Liv1. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 9514-9562) dirigidas a Liv1. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células MCF7 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 4 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan las CAR de Integrina B7 inducen citotoxicidad en las células que expresan la Integrina B7. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 2533-2581) que se dirigen a la Integrina B7. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células U266 que expresan GLuc de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 4 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan SLC34A2 CARs inducen citotoxicidad en células que expresan SLC34A2. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3562-3610) dirigidas a SLC34A2. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células OVCAR-3 y OVCAR-4 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan LY6E CAR inducen citotoxicidad en células que expresan LY6E. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 2582-2630) dirigidas a LY6E. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células Molm13 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 4 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan CAR de LYPD1 inducen citotoxicidad en células que expresan LYPD1. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 2631-2679) dirigidas a LYPD1. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células OVCAR-3 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan STEAP1 CARs inducen citotoxicidad en células que expresan STEAP1. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3513-3561, 9563-9611) dirigidas a STEAP1. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células PC3 y LNCaP que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan las CAR de Muc5Ac inducen citotoxicidad en las células que expresan Muc5Ac. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 2974-3022) dirigidas a Muc5Ac. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células Capan-1 (cáncer de páncreas) y NCI-H1437 que expresan GLuc de manera estable se cultivan conjuntamente con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Los linfocitos T que expresan los CAR de Muc17 inducen citotoxicidad en las células que expresan Muc17. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3023-3071) que se dirigen a Muc17. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células SW1463 y SW403 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan RNF43 CAR inducen citotoxicidad en células que expresan RNF43. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3366-3463) dirigidas a RNF43. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células Lovo que expresan GLuc de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan los CAR de Robo4 inducen citotoxicidad en las células que expresan Robo4. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 3464-3512) dirigidas a Robo4. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células ME-1 que expresan GLuc de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Los linfocitos T que expresan los CAR de gPNMB inducen citotoxicidad en las células que expresan gPNMB. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 2239-2287) dirigidas a gPNMB. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células U87MG que expresan GLuc de manera estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Las células T que expresan FCRH5 CAR inducen citotoxicidad en células que expresan FCRH5. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR (SEQ ID NO: 1994-2042) que se dirigen a FCRH5. Las células CAR-T se expanden in vitro durante 10-14 días. Las células REC-1 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes CAR en una relación E: T de 10: 1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células CAR-T se ensaya usando el ensayo Matador mediante la medición de la actividad GLuc. La actividad in vivo de los CAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

Eficacia in vivo de los CAR que se dirigen a CD19. Las células T de sangre periférica humana aisladas usando perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones CAR CD19 (por ejemplo, SEQ ID NO: 8633-8680). Los ratones NSG (Jackson Lab) se irradian de forma subletal a una dosis de 175 cGy. Aproximadamente 24 horas después de la irradiación (día 2), se inyectan a los ratones $2,5 \times 10^4$ células RAJI a través de la vena de la cola. El día 3, los ratones (n = 5 para cada grupo) se tratan con 5 millones de células CD19 CAR-T. Los ratones de control (n = 5) no reciben células T o células T no infectadas. A los ratones se les administra IL2 humana (400 UI por vía intraperitoneal) en días alternos hasta la muerte de todos los ratones del grupo de control. Los ratones que reciben las células CD19 CAR-T sobreviven más que los ratones de control. Esencialmente, se usa un enfoque similar para probar la eficacia in vivo de otras células CAR T de la divulgación usando xenoinjertos de líneas celulares que expresan sus antígenos diana como se muestra en la Tabla A o usando información disponible en la literatura.

Uso de células CAR-T para terapia celular adoptiva. Las células CAR-T de la divulgación pueden usarse para terapia celular adoptiva. Por ejemplo, los pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) recidivante, leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfomas de células B de grado intermedio de alto riesgo pueden recibir inmunoterapia con células CAR-T transferidas adoptivamente dirigidas a CD19. Un producto de leucaféresis recolectado de cada paciente se sometió a la selección de linfocitos T

positivos para CD3 usando el sistema CliniMACS Prodigy® de Miltenyi Biotec y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células se transducen con virus CD19-CAR de grado clínico (por ejemplo, SEQ ID NO: 14056, SEQ ID NO: 14109, SEQ ID NO: 16330; SEQ ID NO: 903, SEQ ID NO: 791] y luego la selección y expansión de las células CAR-T ocurren en un sistema cerrado.

5 Una vez que los productos celulares resultantes se han sometido a pruebas de control de calidad (incluyendo las pruebas de citotoxicidad específica para la esterilidad y tumores), se someten a criopreservación. Mientras tanto, después de la leucaféresis, los participantes en el estudio comenzaron con quimioterapia linfodepletiva (30 mg/m²/día de fludarabina más 500 mg/m²/día de ciclofosfamida x 3 días). Un día después de la finalización de su régimen linfodepletivo, el producto
10 celular CAR-T previamente almacenado se transportó, se descongeló y se infundió en la cabecera del paciente. El participante del estudio recibió linfocitos transducidos por CAR por vía intravenosa seguido de alta dosis (720,000 UI/kg) de IL-2 (Aldesleukin; prometheus, San Diego, CA) cada 8 horas hasta la tolerancia. La dosis del producto CAR-T varía de 1 x 10⁴ células CAR+ve CD3/kg a 5 x 10⁹ CAR+ve CD3 células/kg según el protocolo de estudio. El producto CAR-T se puede administrar en una sola
15 infusión o infusiones divididas. Los participantes de la investigación pueden recibir la medicación previa al menos 30 minutos antes de la infusión de células T con 15 mg/kg de acetaminofeno PO (máx. 650 mg) y difenhidramina 0.5-1 mg/kg IV (dosis máxima de 50 mg). El participante del estudio puede opcionalmente recibir inyecciones diarias de IL-2 humana. Los estudios clínicos y de laboratorio correlativos de seguimiento se pueden realizar luego a criterio del médico, y pueden incluir estudios
20 cuantitativos de RT-PCR para la presencia de células de LLA/linfoma que expresan CD19 y/o células T transferidas de forma adoptiva; fDG-PET y/o tomografías computarizadas; examen de médula ósea para la evaluación patológica específica de la enfermedad; biopsia de ganglio linfático; y/o seguimiento a largo plazo según las pautas establecidas por el Comité Asesor de Modificadores de la Respuesta Biológica de la FDA que se aplica a los estudios de transferencia de genes. Esencialmente, se puede
25 usar un procedimiento similar para tratar otras enfermedades usando células inmunes (por ejemplo, células T) que se modifican para expresar el CAR de la descripción donde el CAR se dirige a un antígeno o antígenos expresados en las células causantes de la enfermedad o asociadas a la enfermedad.

Uso de células CAR-T autólogas dirigidas a múltiples antígenos para la terapia
30 **celular adoptiva.** Los pacientes con muchos cánceres están inscritos en un ensayo clínico de fase I aprobado por el IRB de inmunoterapia con células CAR-T transferidas de forma adoptiva dirigidas a diferentes antígenos causantes o asociados a la enfermedad. Los CAR para diferentes enfermedades se seleccionan en función de la expresión conocida de su antígeno objetivo en las células causantes de la enfermedad o asociadas a la enfermedad. Cuando sea posible, la expresión del objetivo de CAR
35 en las células causantes de la enfermedad o asociadas a la enfermedad se confirma por la unión con la proteína de fusión ABD-GGS-NLuc en donde el dominio de unión al antígeno de CAR se fusiona con una forma no secretora de la proteína NLuc a través de un enlazador flexible. Alternativamente, se usa inmunohistoquímica o citometría de flujo usando anticuerpos disponibles comercialmente para confirmar la expresión del objetivo CAR en células causantes de enfermedades o asociadas a
40 enfermedades. Las células T se recolectan del sujeto por leucoféresis, se transducen con el vector de lentivirus codificante de CAR apropiado y se expanden ex vivo usando perlas de CD3/CD28 en un

sistema cerrado. Una vez que los productos celulares resultantes se han sometido a pruebas de control de calidad (incluyendo las pruebas de citotoxicidad específica para la esterilidad y tumores), se someten a criopreservación. Mientras tanto, los participantes en el estudio comienzan con quimioterapia linfodepletiva (30 mg/m²/día de fludarabina más 500 mg/m²/día de ciclofosfamida x 3 días). Un día después de completar su régimen de linfodepleción, el participante del estudio recibe linfocitos transducidos infundidos por vía intravenosa seguidos de dosis altas (720,000 UI/kg) de IL-2 (Aldesleukin; prometheus, San Diego, CA) cada 8 horas hasta la tolerancia. El producto de células CAR-T previamente almacenado se transporta, descongela y se infunde al lado de la cama del paciente. La dosis del producto CAR-T varía de 1 x 10⁴ células CAR+ve CD3/kg a 5 x 10⁹ células CAR+ve CD3/kg según el protocolo de estudio. El producto CAR-T se puede administrar en una sola infusión o infusiones divididas. Los participantes de la investigación pueden recibir la medicación previa al menos 30 minutos antes de la infusión de células T con 15 mg/kg de acetaminofeno PO (máx. 650 mg) y difenhidramina 0.5-1 mg/kg IV (dosis máxima de 50 mg). El participante del estudio puede opcionalmente recibir inyecciones diarias de IL-2 humana. Los estudios clínicos y de laboratorio de seguimiento correlativo se pueden realizar a criterio del médico.

Uso de quimioterapia tanto mieloablativa como linfodeplectora antes de la terapia celular adoptiva

Esencialmente se usa un protocolo similar al descrito en el ejemplo anterior con la excepción de que el participante del estudio recibe un régimen de quimioterapia tanto mieloablativa como linfodeplectora. Los regímenes de acondicionamiento mieloablativo ejemplares incluyen FCE (fludarabina 25 mg / m² / día, días -7 a -3; ciclofosfamida 200 mg / m² / día, días -7 a -3; y etopósido 250 mg / m² / día, días -4 a -3), FCIE (fludarabina 25 mg / m² / día, días -7 a -3; ciclofosfamida 200 mg / m² / día, días -7 a -3; idarubicina 12 mg / m² / día, días -7 a -5 y etopósido 250 mg / m² / día, días -4 a -3), FluCyE (fludarabina 30 mg / m² / día, citarabina 1,5 g / m² / día administrados después de fludarabina y etopósido 100 mg / m² / día con cada uno de los fármacos administrado los días -6 a -1), o FE (fludarabina 30 mg / m² / día y etopósido 100 mg / m² / día los días -5 a -1) o etopósido (50-100 mg / m² / día los días -5 al día -1). El sujeto recibe productos de células CAR-T 24-72 horas después de la finalización de la quimioterapia. La incidencia y gravedad del síndrome de liberación de citocinas y la neurotoxicidad se reducen en pacientes que reciben quimioterapia tanto mieloablativa como linfodeplectora antes de la administración de células CAR-T.

Uso de un inhibidor de mTOR RAD001 en combinación con células SIR-T. El estudio se realizó como se describe en los ejemplos anteriores, con la excepción que a partir de 1 día después de la infusión de células SIR-T, a los participantes del estudio se les administró un inhibidor de mTOR, *por ejemplo*, un inhibidor alostérico, *por ejemplo*, RAD001, en una dosis que proporciona el nivel mínimo objetivo de 0.1 a 3 ng/ml, donde el nivel mínimo se refiere a la concentración de un fármaco en plasma justo antes de la siguiente dosis, o la concentración mínima de fármaco entre dos dosis.

Uso de Ibrutinib en combinación con células CAR-T. El estudio se realizó como se describe en los ejemplos anteriores, con la excepción que a partir del 1 día después de la infusión de las células SIR-T, a los participantes del estudio se les administró ibrutinib oral a una dosis de 140 mg/día a 420 mg/d. Se observa que la parte del estudio que recibe ibrutinib tiene menos incidencia de

síndrome de liberación de citocinas grave en comparación con los participantes que recibieron células SIR-T sin ibrutinib.

Uso de células CAR-T alogénicas para la terapia de células adoptivas. Los pacientes con mieloma recidivante y linfoma de derrame primario pueden recibir inmunoterapia con células CAR-T alogénicas transferidas adoptivamente. Un producto de leucocitaféresis obtenido de un donante compatible con HLA se somete a la selección de linfocitos T CD3 positivos utilizando el sistema CliniMACS Prodigy® de Miltenyi Biotec y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El CAR específico de BCMA (SEQ ID NO: 12837, 12890, 12943 o 13049) se dirige al locus TRAC en las células T esencialmente como se describe en el estudio de Eyquem J et al (Nature, 543 (7643): 113-117). Las células se expanden durante 9-12 días en un sistema cerrado. Una vez que los productos celulares resultantes se han sometido a pruebas de control de calidad (incluyendo las pruebas de citotoxicidad específica para la esterilidad y los tumores), se someten a crioconservación. Mientras tanto, los participantes en el estudio comienzan con quimioterapia linfodepletiva (30 mg/m²/día de fludarabina más 500 mg/m²/día de ciclofosfamida x 3 días). Un día después de completar su régimen de linfodepleción, el participante del estudio recibe linfocitos transducidos infundidos por vía intravenosa seguidos de dosis altas (720,000 UI/kg) de IL-2 (Aldesleukin; prometheus, San Diego, CA) cada 8 horas hasta la tolerancia. El producto de las células CAR-T se transporta, descongela y se infunde al lado de la cama del paciente. La dosis de producto CAR-T puede variar de 1 x 10⁴ células CAR+ve CD3/kg a 5 x 10⁹ células CAR+ve CD3/kg según el protocolo de estudio. El producto CAR se puede administrar en una sola infusión o infusiones divididas. Los participantes de la investigación pueden recibir la medicación previa al menos 30 minutos antes de la infusión de células CAR-T con 15 mg/kg de acetaminofeno PO (máx. 650 mg) y difenhidramina 0.5-1 mg/kg IV (dosis máxima 50 mg). El uso de fármacos inmunosupresores también es a discreción del médico. Esencialmente, se puede usar un procedimiento similar para tratar otras enfermedades usando células inmunes alogénicas (por ejemplo, células T) que expresan el CAR de la descripción donde el CAR se dirige a un antígeno o antígenos expresados en las células causantes de la enfermedad o asociadas a la enfermedad.

Infusión Arterial Hepática de Células CAR-T. Además de la infusión intravenosa, las células CAR-T se pueden infundir intraarterialmente para proporcionar una alta concentración de células CAR-T en un área local u órgano involucrado con una enfermedad. En el siguiente ejemplo, este enfoque se usa en el caso de un paciente con metástasis hepáticas de un cáncer de ovario que expresa mesotelina (MSLN). Esencialmente, se puede usar un procedimiento similar para la infusión intraarterial de células CAR-T dirigidas a otros antígenos de tumor.

Un angiograma de mapeo se realizó a través de un procedimiento de arteria femoral común derecha en la línea base. Las arterias gastroduodenal y gástrica derecha, además de otras fuentes potenciales de perfusión extrahepática, se embolizan con microcoils. El mismo procedimiento de acceso arterial se lleva a cabo para la administración de linfocitos T que expresan los CAR de MSLN solos o en combinación (SEQ ID NO: 16331-16334; 14268-14269; 14321 o 14374). Las células T se recolectan del paciente el día 0 y se infectan con lentivirus que codifican para CAR y se expanden como se describe en los ejemplos anteriores. Las células CAR-T se administrarán de forma escalonada en la dosis el día 14 (108 células CAR-T), el día 28 (109 células CAR-T) y el día 44 (1010 células CAR-T). Las células CAR-T se inyectan manualmente a través de una jeringa de 60 cc a una velocidad de <2 cc/segundo.

El volumen total de infusión es de aproximadamente 100 cc. La angiografía con tasa de contraste calibrada se realiza después de la primera infusión de 50 cc y al finalizar la infusión de CAR-T para confirmar el flujo arterial conservado. Las infusiones se administran en la arteria hepática adecuada cuando es posible. Ciertos pacientes tienen una anatomía arterial hepática aberrante, donde la arteria hepática derecha o izquierda no se origina en la arteria hepática adecuada. En tales casos, la dosis de células CAR-T se divide según los cálculos del volumen lobar. En tales casos, las dosis divididas se administran por separado en las arterias hepáticas derecha e izquierda para asegurar un suministro proporcional de CAR-T a ambos lóbulos hepáticos. Las evaluaciones clínicas se realizan al inicio del estudio, en los días de infusión, y 1, 2, 4, y 7 días después de la infusión.

La administración intraperitoneal de células CAR-T. Las células SIR-T también se pueden administrar por vía intraperitoneal, esencialmente como se describe en Koneru M et al (Journal of Translational Medicine; 2015; 13: 102). En el siguiente ejemplo, este procedimiento se usa en casos de pacientes con afectación peritoneal con cáncer de ovario que expresan el Receptor alfa de folato (FR1 o FOLR1). Esencialmente, se puede usar un procedimiento similar para la infusión intraperitoneal de células CAR-T dirigidas a otros antígenos de tumor.

Un consentimiento informado de selección se ofrecerá a los pacientes con cáncer de ovario seroso de alto grado recurrente para probar su cáncer para la expresión de FR1 (FOLR1). En el caso que la expresión de FR1 sea confirmada por inmunohistoquímica, los pacientes tendrán un producto de leucoféresis obtenido de sangre periférica. En la fase de tratamiento del estudio, el producto de leucoféresis se descongelará y se lavará. Posteriormente, las células T CD3+se aislarán del producto de leucoféresis descongelado por separación magnética usando cuentas de CD3/CD28. Las células T activadas serán transducidas de forma lentiviral con un FOLR1 CAR [SEQ ID NO: 2120 o 2121] y se expandirán aún más usando el protocolo de expansión de perlas de CD3/CD28.

Estas células T autólogas se modificarán mediante ingeniería genética para expresar el CAR FOLR1 [SEQ ID NO: 2120 o 2121]. Los pacientes con un tumor recurrente de ovario seroso de alto grado, peritoneal primario o de trompa de Falopio que expresan el antígeno FR1 confirmado por análisis inmunohistoquímico (IHC) de tumores almacenados en bancos (parafina incrustada) o recién biopsiados serán potencialmente elegibles para el estudio.

Se infundirán cohortes de 3 a 6 pacientes con dosis crecientes de células T modificadas para establecer la dosis máxima tolerada (DMT). Hay cuatro niveles de dosis planificados: 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 y 1×10^7 células FOLR1 CAR-T/kg. Cohorts I and II will be treated with 3×10^5 FOLR1 [SEQ ID NO: 2120 or 2121] CAR-T cells/kg but patients in cohort II will also receive lymphodepleting cyclophosphamide. Las cohortes I y II se tratarán con 3×10^5 células FOLR1 CAR-T/kg [SEQ ID NO: 2120 or 2121], pero los pacientes de la cohorte II también recibirán ciclofosfamida linfodepletada. Las cohortes II-V recibirán dosis crecientes de las células T modificadas después del tratamiento previo con ciclofosfamida. Se administrará ciclofosfamida linfodepletada a dosis de 750 mg/m² 2-4 días antes de la infusión inicial de células T. Se seguirá un esquema de escalado de dosis estándar de 3+3. Si la primera dosis supera la MTD, se tratará una cohorte posterior de 3 a 6 pacientes al nivel de dosis de -1 de 1×10^5 células FOLR1 CAR-T/kg sin la adición de ciclofosfamida linfodepletada (cohorte -I).

Un catéter IP será colocado antes de la infusión de células T. El catéter se colocará cuando las células T modificadas estén listas para la administración. Los pacientes serán admitidos en la unidad

de hospitalización del hospital antes de su primera infusión de células T con CAR y permanecerán hospitalizados hasta al menos 3 días después de la segunda infusión de células T con CAR. La primera cohorte de pacientes a tratar, y el primer paciente tratado en cada cohorte posterior, serán admitidos en la unidad de cuidados intensivos (UCI); los pacientes posteriores pueden ser admitidos en la oncología médica en - servicio al paciente (sujeto al juicio clínico del médico responsable del tratamiento).

Los pacientes recibirán una dosis única de quimioterapia con ciclofosfamida linfodepletada (750 mg/m² por vía intravenosa) 2 a 4 días antes de iniciar el tratamiento con células T modificadas con CAR. Las células T transducidas se someterán a pruebas de calidad para determinar el número, la pureza, la viabilidad y la esterilidad antes de la infusión. Todos los pacientes recibirán 50% de la dosis de células T genéticamente modificadas por vía intravenosa. Los pacientes serán monitoreados de cerca por toxicidades. De uno a 3 días más tarde, la dosis restante de células T se administrará como una infusión IP.

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir de todos los pacientes antes y después del tratamiento para evaluar la toxicidad, los efectos terapéuticos, y la supervivencia de las células T genéticamente modificadas.

Uso de células CAR-T para la inyección intratumoral. Las células CAR-T también se pueden administrar por vía intratumoral, esencialmente como se describe en Brown CE, et al, Clin Cáncer Res. 2015, 15 de septiembre; 21(18): 4062-4072. En el siguiente ejemplo, este procedimiento se usa en el caso de pacientes con glioblastoma recurrente (GBM) que expresa EGFRviii. Esencialmente, se puede usar un procedimiento similar para la inyección intratumoral de células CAR-T dirigidas a otros antígenos de tumor.

Un estudio piloto de seguridad y viabilidad se realizará para poner a prueba el CAR (SEQ ID NO: 1699 o 1700) que expresa células T en GBM recurrente. Todos los pacientes participantes deberán dar su consentimiento informado por escrito. Los pacientes elegibles incluirán adultos (18-70 años) con glioma de grado III o IV supratentorial unifocal recurrente o refractario cuyos tumores no muestran comunicación con vías ventriculares/LCR y son susceptibles de resección. Los pacientes se inscribirán después del diagnóstico inicial de glioma de alto grado (grado III o IV de la OMS), en ese momento se someterán a una leucoféresis para la recolección de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Estas células se utilizarán para diseñar células T para que expresen EGFRviii CAR (SEQ ID NO: 1699 o 1700) después de la infección con el vector lentiviral correspondiente como se describe en los ejemplos anteriores. Alternativamente, las células CAR-T podrían generarse después de la infección con un vector retroviral o usando un transposón de bella durmiente o por la transfección de ARNm de IVT. Posteriormente, las células CAR-T terapéuticas probadas de liberación se someterán a crioconservación y se almacenarán para uso posterior. En el momento de la primera recurrencia del tumor, el participante de la investigación se someterá a la resección del tumor junto con la colocación de un reservorio/catéter Rickham. Al mismo tiempo, las células terapéuticas CAR-T se descongelarán, se volverán a expandir in vitro usando el protocolo de expansión rápida basado en perlas de CD3/CD28. Después de la recuperación de la cirugía y de las imágenes de MR iniciales, las células CAR-T se administrará directamente en la cavidad de resección a través del catéter permanente, esencialmente como se describe (Brown CE, et al, Clin Cáncer Res. 2015, 15 de septiembre; 21 (18): 4062–4072). Las

células se inyectarán manualmente en el reservorio de Rickham con una aguja de mariposa de calibre 21 para suministrar un volumen de 2 ml durante 5-10 minutos, seguido de 2 ml de descarga con solución salina normal sin conservadores durante 5 minutos. El plan de tratamiento del protocolo especificará un programa de aumento de dosis intra-paciente con un objetivo de 12 dosis de células CAR T administradas intracranalmente durante un periodo de 5 semanas que comprende ciclos de tratamiento semanales. Durante los ciclos 1, 2, 4 y 5, las infusiones de células T se realizarán los días 1, 3 y 5 del ciclo de la semana, y la semana 3 será un ciclo de descanso. Por razones de seguridad, en el ciclo 1 usaremos una estrategia de aumento de dosis intrapaciente, con dosis de célula T de SIR de 10^7 , 5×10^7 y 10^8 células por infusión administradas los días 1, 3 y 5 respectivamente, y esto será seguido por 9 infusiones adicionales de célula T de SIR de 10^8 células de más de 4 semanas. La imagen para evaluar la respuesta se realizará durante el ciclo de descanso de la semana 3 y después de la semana 5 se seguirán las pautas proporcionadas en los Criterios de Toxicidad Comunes del NCI versión 2.0 (<https://ctep.ifo.nih.gov/>) para el monitoreo de toxicidad y notificación de eventos adversos

El uso de células CAR-T para la purga ex vivo de médula ósea o de preparación de células madre de sangre periférica antes del trasplante. Las células CAR T se pueden usar para purgar la médula ósea o la preparación de células madre de sangre periférica de células de cáncer antes del trasplante de células madre. En el siguiente ejemplo, las células CAR-T que expresan BCMA se usan para purgar células madre de la médula ósea o de la sangre periférica obtenidas de un paciente con mieloma múltiple antes del trasplante autólogo de células madre (o médula ósea). Esencialmente se puede usar un enfoque similar para purgar la médula ósea o las preparaciones de células madre de sangre periférica utilizando células CAR-T dirigidos a otros antígenos adecuados que se expresan en células cancerígenas y no tienen expresión o expresión despreciable sobre células madre hematopoyéticas normales.

El paciente se someterá a una leucoféresis para relectar células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células T se purificarán usando perlas de CD3. Estas células se usarán para diseñar células T para expresar el BCMA CAR-CD8SP-BMA-BB-CAR02-vL-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-SP-BMA-BB-CAR02-vH-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-Xba-PAC [SEQ ID NO: 546] que contiene el gen de puomicina-resiestano (PAC) después de la infección con el vector lentiviral correspondiente como se describe en los ejemplos anteriores. Este CAR se dirige a BCMA, un antígeno expresado en células de mieloma. CAR-T que expresa el CAR CD8SP-BCMA-BB-CAR02-vL-[hTCRb-KACIAH]-F-P2A-SP-BCMA-BB-CAR02-vH-[hTCRa-CSDVP]-F-F2A-PAC [SEQ ID NO: 552] or CD8SP-BCMA-BB-CAR02-vL-IgCL-Bam-CD3zECDTMCP-opt-F-P2A-Spe-SP-Bst-BCMA-BB-CAR02-vH-IgG1-CH1-KPN-CD3zECDTMCP-opt2-F-F2A-Xba-PAC [SEQ ID NO: 553] se usará como alternativa o en combinación con las células CAR-T anteriores dirigidas a BCMA.

Alternativamente, las células SIR-T podrían generarse después de la infección con un vector retroviral o usando el transposón de bella durmiente o por la transfección del ARNm de IVT. Posteriormente, las células terapéuticas SIR-T sometidas a prueba se someterán a crioconservación y se almacenarán para uso posterior o se usarán frescas. Las células de la médula ósea y las células progenitoras de sangre periférica se recolectarán de un paciente con mieloma múltiple siguiendo los procedimientos estándar. Para la movilización de células madre de sangre periférica, los pacientes recibirán ciclofosfamida, 3 g/m² seguidos de G-CSF, 10 µg/kg por vía subcutánea cada día, 24 h

después de la ciclofosfamida hasta que se complete la aféresis. Las células madre de sangre periférica se recolectarán una vez que el recuento de células CD34+ en sangre periférica sea de 15 células/ μ l. El objetivo de la recolección será procesar tres volúmenes de sangre por día hasta que se alcance un mínimo de 2.0 veces 10^6 células CD34+/kg después del procesamiento. Los productos de las células madre de la médula ósea y de la sangre periférica se agotarán opcionalmente de los glóbulos rojos y/o enriquecido para células que expresan CD34 usando CliniMACS Prodigy® System de Miltenyi Biotec y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos se usarán para purgar ex vivo frescos o criopreservados. Para la purga, los productos de la médula ósea o de las células madre de la sangre periférica se cocultivarán con células SIR-T descongeladas con un efecto o con una relación objetivo que varía de 5:1 a 30:1 durante 4 a 24 horas en medio XVIVO (Lonza) suplantado con 100 UI de IL2 humana recombinante. Las células serán cultivadas en 37°C, en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Al final del periodo de cocultivo, se tomará una alícuota de las células para las pruebas de esterilidad y calidad (incluyendo la medición de CFU-GM y la citometría de flujo para células positivas para CD34 y CD138). La muestra restante se administrará por vía intravenosa al paciente que haya recibido previamente quimioterapia mieloablativa (por ejemplo, dosis altas de melfalán en dos dosis divididas de 70 mg/m² para una dosis total de 140 mg/m²).

Uso de la selección *in vitro* e *in vivo* para seleccionar SIR con las propiedades deseadas. Un grupo de CAR dirigidos a CD19 listados en las Tablas 7 se dirigen al locus de TRAC en células T usando ARNg de TRAC y técnicas conocidas en la técnica. El vector de direccionamiento también lleva códigos de barras de ADN ubicados corriente abajo del codón de parada de los insertos CAR. Las células T pueden derivar de la sangre periférica. En una modalidad alternativa, las células T se derivan de un solo clon de iPSC o células madre hematopoyéticas usando técnicas conocidas en la técnica. Las células T que expresan el grupo de CAR se cocultivaron con células RAJI *in vitro* durante 1 a 21 días. Se recolectaron alícuotas de los grupos de células CAR-T antes del cultivo con las células objetivo y en diferentes días después del cocultivo. Las muestras se sometieron a la secuenciación de próxima generación para determinar la frecuencia relativa de diferentes CAR después de la exposición a las células objetivo. Los análisis bioinformáticos se usaron para determinar los CAR que se asocian con una mejor respuesta proliferativa después del cocultivo con las células objetivo. Esencialmente, se utilizó un procedimiento similar para determinar los CAR que confieren mayor potencial proliferativo en células T *in vivo* y/o persisten a largo plazo *in vivo* y/o están presentes en una frecuencia mayor cuando se normalizan para su frecuencia en la población de células T de partida en los animales sobrevivientes en comparación con los animales que sucumben a la exposición al tumor. En modalidades alternativas de la descripción, esencialmente un procedimiento similar se utilizó en muestras clínicas humanas para identificar CAR que están asociados con diferentes propiedades y/o resultados incluyendo, pero no limitado a, mejor supervivencia a largo plazo, menor incidencia de síndrome de liberación de citocinas, menor neurotoxicidad y/o mayor persistencia a largo plazo. Los CAR se pueden usar posteriormente, individualmente o en varias combinaciones, para desarrollar diferentes subgrupos de CAR, que contienen CAR que se dirigen a los mismos dominios de unión al antígeno o a diferentes, con diversas propiedades para el tratamiento de diferentes enfermedades y diferentes pacientes. En otras habilitaciones, las células CAR-T se exponen a su línea celular objetivo y luego se clasifican en diferentes conjuntos con base en el grado de IFN γ intracelular determinado por citometría de flujo. La

frecuencia de diferentes CAR en la población de alto versus alto IFN γ se determinó por la secuenciación de próxima generación y se normalizó a su frecuencia en la población de células CAR-T de control, es decir, las células CAR-T que no han sido expuestas a la línea celular objetivo o están expuestas a una línea celular que no expresa el objetivo de CAR. A partir de este análisis, se pueden determinar los

5 CAR que están asociados con diferentes niveles de producción de IFN γ . Se utilizó un procedimiento similar para detectar y seleccionar CAR con cualquiera o una combinación de propiedades o atributos deseados que incluyen, pero no se limitan a, menor producción de TNF α , menor expresión de marcadores de agotamiento, menor expresión de marcadores de diferenciación terminal y/o mayor expresión de marcadores de citotoxicidad.

10 **La proteína Vif del VIH-1 potencia la transducción y expresión génica mediada por lentivirales.** Se sembraron células 293FT en 10 ml de medio DMEM-10 sin antibióticos en una placa de cultivo de tejidos de 10 cm de modo que fueran aproximadamente un 80% confluentes el día de la transfección. Al día siguiente, las células se transfectaron mediante el método de transfección con

15 fosfato de calcio utilizando 10 μ g de plásmido de expresión lentiviral que codifica una SEQ ID NO: 11244) o un CAR de segunda generación dirigido a CD19 y coexpresando la proteína Vif del VIH-1 (SEQ ID NO: 11245) y plásmidos de envasado (7,5 μ g de plásmido PSPAX2 y 2 μ g de PLP / VSVG). Aproximadamente 15-16 horas después de la transfección, se retiran 9 ml de medio y se reemplazan con 5 ml de medio fresco. Aproximadamente, 48 horas después de la transfección, se recolectan 5 ml de sobrenadante (primera recolección) y se reemplazan con medio fresco de 5 ml. Aproximadamente

20 72 horas después de la transfección, se recogieron todos los medios (segunda recogida, normalmente alrededor de 6 ml). Los sobrenadantes recogidos se combinan y se centrifugan a 1000 rpm durante 1 minuto para eliminar cualquier residuo celular y células no adherentes. El sobrenadante libre de células se filtra a través de un filtro de jeringa de 0,45 μ m. El título de los lentivirus se mide usando p24 ELISA. Las células de la capa leucocitaria se obtienen de donantes adultos sanos no identificados del Banco

25 de Sangre y se utilizan para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente Ficoll-Hypaque. Las PBMC se utilizan para aislar células T mediante microperlas magnéticas CD3 (Miltenyi Biotec) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células T se resuspenden en medio XVIVO (Lonza) reemplazado con 10 ng / ml de anticuerpo CD3, 10 ng / ml de anticuerpo CD28 y 100 UI de IL2 humana recombinante. Las células T purificadas se infectan con

30 cantidades iguales de vector de lentivirus que codifica el CAR de segunda generación dirigido a CD19 (SEC ID NO: 11244) o un CAR de segunda generación dirigido a CD19 y coexpresando la proteína Vif del VIH-1 (SEC ID NO: 11245). Ambas construcciones CAR también llevan una etiqueta de epítipo MYC. La expresión de CAR en las células T se examina mediante inmunotinción con un anticuerpo MYC conjugado con APC y análisis FACS 48 horas después de la infección. Se encuentra que un

35 porcentaje significativamente mayor de células T están infectadas con la construcción CAR que coexpresa Vif en comparación con la construcción CAR sin expresión de Vif.

El análisis FACS se repite 3 días después de la infección. De nuevo, se encuentra que un porcentaje significativamente mayor de células T están infectadas con la construcción CAR que coexpresa Vif en comparación con la construcción CAR sin expresión de Vif.

El experimento también se repite en la línea celular BC-1. De nuevo, se encuentra que un porcentaje significativamente mayor de células BC-1 están infectadas con la construcción CAR que coexpresa Vif en comparación con la construcción CAR sin expresión de Vif.

REIVINDICACIONES

Lo reclamado es:

1. Al menos un polinucleótido recombinante que codifica al menos un receptor de antígeno quimérico (CAR) de primera o próxima generación, comprendiendo el al menos un polinucleótido recombinante:
 - 5 (a) un primer dominio de ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana y / o citoplasmático parcial o completo y, opcionalmente, el dominio extracelular de una proteína endógena, donde la proteína endógena se expresa en la superficie de los linfocitos y desencadena la activación y / o proliferación de la linfocito;
 - (b) opcionalmente un polinucleótido un enlazador; y
 - 10 (c) un segundo dominio de ácido nucleico unido operativamente al primer dominio de ácido nucleico, en el que el segundo dominio de ácido nucleico codifica uno o más dominios de unión al antígeno TCR no naturales en los que el dominio de unión se selecciona de un dominio de unión establecido en Tabla 3;
 - (d) un tercer dominio de ácido nucleico opcional que codifica un dominio coestimulador; y un dominio
 - 15 de ácido nucleico adicional opcional que codifica un módulo accesorio.
2. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 1, en el que el primer ácido nucleico codifica parcial o totalmente al menos una cadena de receptor de células T (TCR) como se establece en la Tabla 13.
3. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 2, en el que el primer ácido nucleico
- 20 codifica al menos un dominio transmembrana en la Tabla 13 unido operativamente al dominio citoplásmico del tipo TCR.
4. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido codifica un CAR, en el que el CAR comprende:
 - (i) una cadena constante del receptor de células T (TCR) parcial o completo que tiene una secuencia
 - 25 de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 4038 a 4063, 12602-12638, y que puede comprender un módulo coestimulador opcional;
 - (ii) un enlazador opcional; y
 - (iii) uno o más dominios de unión a antígeno de TCR no naturales unidos a (i) seleccionados de un
 - 30 dominio de unión establecido en la Tabla 3;
 - (iv) un módulo de acceso opcional; y
 - (v) un dímero de un polipéptido que comprende (i) - (iv).
5. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 4, en el que el polinucleótido recombinante comprende una secuencia que codifica cualquiera de las secuencias de la Tabla 2.

6. El al menos un polinucleótido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el módulo accesorio comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4103-4117 y 4090-4096.
7. El al menos un polinucleótido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el CAR codificado comprende (1) cualquiera de los CAR 1-16 de la Tabla 1 y / o (2) un esqueleto de la Tabla 2; y (3) un dominio de unión de la Tabla 3.
8. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 4, en el que (i) es una cadena constante de TCR de CD3z.
9. El al menos un polinucleótido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que codifica dos receptores de antígenos quiméricos de primera generación o de próxima generación.
10. El al menos un polinucleótido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que codifica un dímero de cadenas constantes CD3z.
11. Al menos un polinucleótido recombinante que codifica al menos un receptor de antígeno quimérico (CAR) de próxima generación, comprendiendo el al menos un polinucleótido recombinante:
- 15 (a) un primer dominio de ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana y / o citoplasmático parcial o completo y, opcionalmente, el dominio extracelular de una proteína CD3z endógena que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4064-4066, 4070-4072, y 4075-4078, en el que la proteína endógena se expresa en la superficie de los linfocitos y desencadena la activación y / o proliferación del linfocito;
- 20 (b) opcionalmente un polinucleótido un enlazador; y
- (c) un segundo dominio de ácido nucleico unido operativamente al primer dominio de ácido nucleico, en el que el segundo dominio de ácido nucleico codifica uno o más dominios de unión al antígeno TCR no naturales en los que el dominio de unión se selecciona de un dominio de unión establecido en Tabla 3; y
- 25 (d) un tercer dominio de ácido nucleico opcional que codifica un módulo coestimulador; y
- un ácido nucleico adicional opcional que codifica un módulo accesorio.
12. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 11, en el que las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína CD3z endógena se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 67 y 71.
- 30 13. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 11 o 12, en el que el al menos un CAR de próxima generación comprende dos CAR, cada CAR que comprende una cadena CD3z.
14. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 13, en el que un fragmento vL de un anticuerpo está operativamente unido a una de las dos cadenas CD3z y un fragmento vH del anticuerpo está operativamente unido a la otra cadena CD3z.

15. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 14, en el que las cadenas vL y vH se seleccionan de pares en la Tabla 3 y 4 para un antígeno diana específico.
16. Al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 14 o 15, en el que se proporciona un enlazador entre las cadenas vL / vH y / o CD3z.
- 5 17. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 16, en el que un enlazador codificado se selecciona del grupo que consiste en IgCL (SEQ ID NO (ADN): 28 y SEQ ID NO (PRT): 4027) y dominios IgCH (SEQ ID NO (ADN): 29 y SEQ ID NO (PRT): 4028).
18. Al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 11, que comprende además el tercer dominio de ácido nucleico que codifica un módulo coestimulador.
- 10 19. Al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 17, en el que el módulo estimulante comprende una proteína 41BB o CD28.
20. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 18 o 19, en el que el módulo coestimulador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4067 y 4068.
- 15 21. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 18, en el que el módulo coestimulador comprende un dominio de señalización de uno cualquiera o más de CD134 (OX40), Dap 10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 y combinaciones de los mismos.
22. El al menos un polinucleótido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 11-21, que comprende además el módulo accesorio, en el que el módulo accesorio comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4103-4117 y 4090-4096.
- 20 23. Una célula recombinante que expresa un homo o heterodímero de un receptor de antígeno quimérico (CAR) de primera o próxima generación, comprendiendo el homo o heterodímero:
- (a) un primer dominio que codifica un dominio transmembrana y / o citoplasmático parcial o completo y, opcionalmente, el dominio extracelular de una proteína endógena, en donde la proteína endógena se expresa en la superficie de los linfocitos y desencadena la activación y / o proliferación del linfocito;
- 25 (b) opcionalmente un péptido enlazador; y
- (c) un segundo dominio unido operativamente al primer dominio, en el que el segundo dominio comprende uno o más dominios de unión al antígeno TCR no naturales en los que el dominio de unión se selecciona de un dominio de unión indicado en la Tabla 3; y
- 30 (d) un tercer dominio opcional que codifica un módulo coestimulador, y
- donde la celda comprende opcionalmente un módulo accesorio,
- en el que el homo o heterodímero se asocia en la superficie de la célula recombinante.

24. Célula recombinante según la reivindicación 23, en la que la célula se transforma con al menos un polinucleótido recombinante o cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

25. La célula recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, en la que la célula es un linfocito T (célula T).

5 26. La célula recombinante de cualquiera de las reivindicacion 25, en la que la célula es una célula T ingenua, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora, Treg o una combinación de las mismas.

10 27. La célula recombinante de cualquiera de las reivindicacion 23, en la que la célula es una célula asesina natural (NK), una célula madre hematopoyética (HSC), una célula madre embrionaria o una célula madre pluripotente.

28. La célula recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 23-27, en la que el módulo accesorio comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4103-4117 y 4090-4096.

29. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende:

15 (a) un primer dominio que codifica un dominio transmembrana y / o citoplasmático parcial o completo y, opcionalmente, el dominio extracelular de una proteína endógena, en donde la proteína endógena se expresa en la superficie de los linfocitos y desencadena la activación y / o proliferación del linfocito;

(b) opcionalmente un péptido enlazador; y

20 (c) un segundo dominio unido operativamente al primer dominio, en el que el segundo dominio comprende uno o más dominios de unión al antígeno TCR no naturales en los que el dominio de unión se selecciona de un dominio de unión indicado en la Tabla 3; y

(d) un tercer dominio opcional que codifica un módulo coestimulador.

30. El receptor de antígeno quimérico de la reivindicación 29, en el que la proteína endógena comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4064-4066, 4070-4072, 4075-4078 y 12637.

25 31. El al menos un polinucleótido recombinante de la reivindicación 29, en el que el primer ácido nucleico codifica parcial o totalmente al menos una cadena de receptor de células T (TCR) como se establece en la Tabla 13.

30 32. El receptor de antígeno quimérico de la reivindicación 31, en el que el primero comprende un dominio transmembrana en la Tabla 13 unido operativamente al dominio citoplásmico de un tipo TCR correspondiente.

33. El receptor de antígeno quimérico de la reivindicación 29, en el que el CAR comprende:

35 (i) una cadena constante del receptor de células T (TCR) parcial o completa que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 4038 a 4063, 12602-12638, y que puede comprender un módulo coestimulador opcional.

34. Un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 29-33.

35. Un vector que comprende el polinucleótido de la cláusula 34.

36. Un virus que comprende el polinucleótido de la cláusula 35.

5 37. El virus de la cláusula 36, en el que el virus es un retrovirus, un adenovirus, un virus adenoasociado, un lentivirus, un virus de la viruela o un virus del herpes.

38. Una composición farmacéutica que comprende: uno o más de los al menos un polinucleótido de las reivindicaciones 1-22, la célula recombinante de las reivindicaciones 23-28, el CAR de la reivindicación 29-33, el vector de la reivindicación 35 o el virus de la reivindicación 36.

10 39. Un método para tratar el cáncer que comprende: proporcionar la composición de la reivindicación 38 o una célula recombinante de la reivindicación 23; y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición o célula al sujeto para tratar el cáncer.

40. El método de la cláusula 39, en el que el cáncer es cáncer de sangre.

15 41. El método de la cláusula 40, en el que el cáncer de sangre es uno o más de leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásico, linfoma, mieloma múltiple y leucemia linfocítica aguda.

42. La al menos una célula recombinante de la reivindicación 21, en la que el al menos un polinucleótido recombinante comprende una secuencia que codifica HIV-1-vif.

43. La célula recombinante de la reivindicación 42, en la que la célula comprende además HIV-1-vif.

RESUMEN

- 5 La divulgación proporciona diversos dominios y plataformas de unión a antígenos para la construcción de receptores de antígenos quiméricos convencionales y de próxima generación para terapias celulares adoptivas para el cáncer, infecciones, trastornos alérgicos, degenerativos e inmunes. También se proporcionan enfoques para la activación y expansión de células T inmunes para terapias celulares adoptivas para cáncer, infecciones, trastornos alérgicos, degenerativos e inmunes.