

1
COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA INMUNOTERAPIA DIRIGIDA A FLT3,
PD-1, Y/O PD-L1

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica la prioridad a tenor de
35 U.S.C. § 119(e) de la Solicitud de Patente Provisional de
los Estados Unidos n.º 62/693.977, presentada el 4 de julio de
2018, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por
10 referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

 La presente divulgación se refiere en general al campo de
15 la inmunología humana, de manera específica a inmunoterapia.

ANTECEDENTES

 La leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés)
20 es un cáncer hematológico común. Se estima que habrá 21.450
nuevos casos previstos en 2019, véase [cancer.org/cancer/acute-
myeloid-leukemia/about/key-statistics.htm](https://cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.htm), última consulta el
2 de julio de 2019. Aunque la enfermedad responde a la
quimioterapia de inducción y consolidación, la recaída se
25 produce inevitablemente en la mayoría de los pacientes. El
protocolo de tratamiento para pacientes con AML mayores de 65
años es especialmente infructuoso, ya que más del 75 % de los
pacientes mueren a causa de su enfermedad en 5 años; por tanto,
el tratamiento no se ha optimizado. Por lo tanto, los nuevos
30 métodos de tratamiento para esta enfermedad deberían ser una
prioridad. La presente divulgación proporciona dichos métodos
novedosos, composiciones para su uso en los mismos y también

ventajas relacionadas.

SUMARIO

5 A pesar de la heterogeneidad de la AML en general, muchos tipos de AML comparten la expresión de FLT3 común, que está presente en alrededor del 80 % de los pacientes, con expresión en la superficie de alta densidad en aproximadamente el 20 % de los pacientes con AML. Además, hasta el 80 % de los
10 blastocitos de pacientes con AML podrían expresar el ligando para PD-1, denominado PD-L1, mientras que la expresión en la superficie de PD-1 se puede encontrar en la mayoría de los linfocitos T de pacientes con AML.

15 La terapia con receptores de antígenos quiméricos (CAR, por sus siglas en inglés) es una de las terapias inmunitarias celulares más exitosas para las neoplasias linfoides. Un CAR es un receptor inmunitario de superficie modificado genéticamente que contiene la porción Fab de un anticuerpo
20 dirigido contra antígeno o antígenos tumorales y unido a dominios intracelulares de moléculas de activación tales como CD28 y CD3 ζ . Los modelos preclínicos de CAR expresados en linfocitos T y en linfocitos citolíticos naturales (NK) dirigidos contra antígenos asociados a AML muestran efectos de
25 tratamiento prometedores. Debido a que las células NK, pero no los linfocitos T, no provocan la enfermedad de injerto contra huésped (GVDH, por sus siglas en inglés), las células NK con CAR pueden ser una alternativa importante a los linfocitos T con CAR. En un estudio reciente sobre linfocitos T con CAR
30 anti-CD19, el 30% de los pacientes con B-ALL no respondieron a la terapia con linfocitos T con CAR debido a las isoformas de

CD19 cortadas y empalmadas de forma alternativa y al epítopo de CAR anti-CD19 comprometido. los linfocitos T carecen de "destrucción natural", es decir, requieren un accionador CAR para destruir las células tumorales. Las células NK poseen

5 citotoxicidad espontánea y, por lo tanto, pueden destruir determinadas dianas tumorales, tal como la AML, incluso en ausencia de la activación de CAR. Por lo tanto, los mecanismos citolíticos intrínsecos de las células NK pueden proporcionar una defensa secundaria contra el escape del cáncer de la

10 terapia con CAR. Comprender cómo funciona el CAR en otras células inmunitarias, tal como las células NK, será impactante y ayudará a crear métodos alternativos o complementarios en el diseño de la próxima generación de terapia con linfocitos T con CAR T y con células NK con CAR.

15

Los inhibidores de puntos de control tal como pembrolizumab anti-PD-1 (Keytruda) y atezolizunab anti-PD-L1 (Tecentriq) y otros se están investigando activamente en muchos ensayos clínicos. Sin embargo, algunas toxicidades han

20 obstaculizado el desarrollo posterior. Por ejemplo, se ha suspendido un ensayo clínico en fase III reciente de pembrolizumab debido a la toxicidad general. Esto podría estar relacionado con la activación masiva de linfocitos T y un efecto autoinmunitario sistémico. Podría ser más conveniente

25 el suministro local de un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1. Análogamente, el tratamiento de la AML con CAR dirigidos contra CD123 o CD33 aún no ha demostrado ningún éxito clínico. Sin quedar limitados a la teoría, El solicitante plantea la hipótesis de que un CAR dirigido a FLT3 expresado

30 en blastocitos de AML tendrá beneficios terapéuticos para los pacientes con AML FLT3(+) con un mejor perfil de seguridad.

Además, los anticuerpos monoclonales (mAb, por sus siglas en inglés) anti-PD-1 y anti-PD-L1 aprobados por la FDA se administran sistémicamente y se unen a todas las células que expresan PD-1(+) o PD-L1. La infusión intravenosa sistémica de estos mAb implica la infusión de grandes dosis y se ha asociado con efectos adversos leves, moderados y graves, incluyendo la fatiga, pirexia (fiebre), escalofríos y "reacciones a la infusión" que requieren atención médica. Las reacciones a la infusión son poco frecuentes, pero pueden provocar una pérdida grave de la presión arterial que requiera reanimación con líquidos junto con medicamentos. Las toxicidades adicionales bien documentadas que varían de leves a graves que se asocian con la administración de estos mAb incluyen toxicidades dermatológicas, gastrointestinales, endocrinas, hepáticas y pulmonares. Véase, p.ej., Naidoo *et al.* (2015) *Annals of Oncology*, Volumen 26, Número 12, páginas 2375-2391. El linfocito T o célula NK con CAR de la presente divulgación elimina la necesidad de múltiples infusiones intravenosas separadas de mAb anti-PD-1 o anti-PD-L1 mediante modificación por ingeniería del linfocito T o célula NK con CAR para secretar los mAb anti-PD-1 o anti-PD-L1 una vez que los linfocitos T o células NK con CAR se infunden dentro del organismo. En consecuencia, el linfocito T o célula NK con CAR de la presente divulgación elimina la necesidad de grandes dosis de carga farmacológica de mAb anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 a infundir en el torrente sanguíneo mediante una administración separada y repetida. Según los datos de farmacología y toxicidad publicados hasta la fecha, es razonable suponer que esta invención evitará que todos los linfocitos T o células NK PD-1(+) se saturen de manera inmediata con mAb anti-PD-1, reduciendo, muy probablemente, algunos o todos los eventos

adversos mencionados anteriormente. Además, (1) la liberación del anticuerpo solo vendría de los linfocitos T o células NK con CAR a medida que se expanden, por lo que la liberación de los mAb anti-PD-1 o anti-PD-L1 en el torrente sanguíneo sería gradual; (2) dado que el CAR aloja los linfocitos T o células NK con CAR en el tumor, la liberación de mAb anti-PD-1 o anti-PD-L1 estaría más confinada al microambiente tumoral en comparación con múltiples administraciones sistémicas intravenosas masivas como está aprobado actualmente por la FDA y por lo tanto su efecto antitumoral se localizaría más en los linfocitos T o células NK correspondientes en el microambiente tumoral. De manera adicional, este enfoque daría como resultado un enorme ahorro de costes (ahorros de costes de aproximadamente seis cifras) para el paciente, ya que no habría necesidad de infusiones de mAb anti-PD-1 o anti-PD-L1.

Inesperadamente, recientemente se ha informado que los linfocitos citolíticos naturales humanos de pacientes con cáncer expresan PD-L1 y que se encontró inesperadamente que el anticuerpo anti-PD-L1 unido a las células NK aumentaba la destrucción de la célula tumoral por las células NK. Por tanto, la presente divulgación, mediante la cual las células NK infectadas expresan tanto un CAR como un anti-PD-L1 secretado podría potenciar significativamente la destrucción por NK de la célula tumoral localmente en el microambiente tumoral.

Para ese fin, en el presente documento se divulgan uno o más vectores o polinucleótidos aislados que comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente en o que consisten además en, un polinucleótido que codifica una secuencia de un ácido nucleico de un receptor de antígenos quimérico (CAR) que

comprende: (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; (b) un dominio de bisagra; (c) un dominio transmembrana; (d) y un dominio intracelular; y un polinucleótido que codifica una secuencia de un ácido nucleico de un anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1. En algunas realizaciones, un polinucleótido contiguo o un vector sencillo comprende, además, o consiste además esencialmente en o que incluso consiste además en ambos polinucleótidos que codifican la secuencia de un ácido nucleico de un CAR que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; (b) un dominio de bisagra; (c) un dominio transmembrana; (d) y un dominio intracelular; y el polinucleótido que codifica la secuencia de un ácido nucleico de un anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1. En otras realizaciones, se proporciona en el presente documento un ácido nucleico aislado o un vector que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en:

20

- a. un polinucleótido que codifica un receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en: (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; (b) un dominio de bisagra; (c) un dominio transmembrana; (d) y un dominio intracelular; y
- b. un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1.

30

En realizaciones adicionales, el vector puede ser policistrónico, opcionalmente bicistrónico y/o cada uno de los polinucleótidos puede unirse operativamente a secuencias polinucleotídicas reguladoras, tales como elementos
5 potenciadores y/o elementos promotores.

Un ejemplo de un polinucleótido contiguo de la presente divulgación se muestra en la **FIG. 1**. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona que cada uno de los polinucleótidos
10 que codifican la secuencia de un ácido nucleico de un CAR como se divulga anteriormente y dentro y en un aspecto, el CAR comprende: (1) (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; (b) un dominio de bisagra; (c) un dominio transmembrana; (d) y un dominio intracelular; y (2) el
15 polinucleótido que codifica la secuencia de un ácido nucleico de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1, los polinucleótidos de (1) y (2) están incluidos en polinucleótidos independientes separados o dentro
20 de vectores separados.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el vector o los vectores es o son un plásmido o un vector vírico, opcionalmente seleccionado del grupo de un vector retrovírico,
25 un vector lentivírico, un vector adenovírico y un vector vírico adenoasociado.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, los polinucleótidos y/o vector o vectores pueden opcionalmente
30 comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o consistir además en un marcador detectable y/o un

polinucleótido que confiere resistencia a antibióticos y/o elementos reguladores para la transcripción y traducción del CAR y el dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1. En un aspecto adicional, los métodos terapéuticos se combinan con métodos de diagnóstico que identifican al sujeto o paciente adecuado para la terapia analizando una muestra adecuada aislada del paciente o sujeto para determinar la expresión de FLT3 y/o PD-1 y/o PD-L1 y determinando que el paciente o el sujeto que expresa uno, dos o tres de FLT3, PD-1 y/o PD-L1, es adecuado para la terapia. En un aspecto adicional, después se administra la terapia al sujeto o paciente. Las muestras adecuadas incluyen aquellas que comprenden células cancerosas y/o tumorales.

El ácido nucleico aislado o vector divulgados anteriormente que codifican el CAR puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en cualquier CAR divulgado en el presente documento. En un aspecto, el ácido nucleico aislado o el vector de la presente divulgación que codifica el CAR comprende además, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un dominio de señalización. En otro aspecto, el ácido nucleico aislado o el vector que codifica el CAR comprende además un elemento inducible o uno constitutivamente activo. En una realización, el elemento inducible o el constitutivamente activo controla la expresión de un polinucleótido que codifica una molécula inmunorreguladora o una citocina. La molécula inmunorreguladora o citocina puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en una o más de B7.1, CCL19, CCL21, CD40L, CD137L, GITRL, GM-CSF, IL-12, IL-2, IL-2 de baja

toxicidad, IL-15, IL-18, IL-21, LEC y/o OX40L. En otro aspecto, la molécula inmunorreguladora o citocina puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en IL-12 y/o GM-CSF; y/o IL-12 y/o uno o más
5 de IL-2 e IL-2 de baja toxicidad; y/o IL-12 y/o IL-15; y/o IL-12 y/o IL-21; IL-12 y/o B7.1; y/o IL-12 y/o OX40L; y/o IL-12 y/o CD40L; y/o IL-12 y/o GITRL; y/o IL-12 y/o IL-18; y/o una o más de IL-2 e IL-2 de baja toxicidad y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o IL-15 y una o más de CCL19, CCL21 y
10 LEC; y/o IL-21 y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o GM-CSF y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o OX40L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o CD137L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o comprende B7.1 y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o CD40L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o GITRL y una o más
15 de CCL19, CCL21 y LEC.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, cada uno de los polinucleótidos puede estar unido operativamente a un polinucleótido regulador, opcionalmente a un promotor y/o
20 potenciador. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 está unido operativamente a un promotor y/o potenciador que permite una expresión baja,
25 moderada o alta, o incluso la sobreexpresión adicional del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el polinucleótido que codifica el CAR puede comprender, o de forma
30 alternativa consistir esencialmente en, o además consistir en un polinucleótido que codifica: (a) un dominio de unión a

antígeno de un anticuerpo de FLT3; (b) un dominio de bisagra de CD8 α ; (c) un dominio transmembrana de CD8 α ; (d) una región de señalización coestimuladora de CD28 y/o una región de señalización coestimuladora de 4-1BB; y (e) un dominio de señalización CD3 zeta (ξ). Ejemplos no limitantes del anticuerpo de FLT3 comprenden, o de forma alternativa consisten esencialmente en, o además consisten en una región variable de cadena pesada que comprende: una CDHR1 que tiene la secuencia de aminoácidos (SYWMH) o (NYGLH) o un equivalente de cada una de las mismas, una CDHR2 que tiene la secuencia de aminoácidos (EIDPSDSYKDYNQKFKD) o (VIWSGGSTDYNAAFIS) o un equivalente de cada una de las mismas y una CDHR3 que tiene la secuencia de aminoácidos (AITTTPFDF) o (GGIYYANHYYAMDY) o un equivalente de cada una de las mismas y/o una región variable de cadena ligera que comprende: una CDLR1 que tiene la secuencia de aminoácidos (RASQISISNNLH) o (KSSQSLLNSGNQKNYM) o un equivalente de cada una de las mismas, una CDLR2 que tiene la secuencia de aminoácidos (YASQISIS) o (GASTRES) o un equivalente de cada una de las mismas y una CDLR3 que tiene la secuencia de aminoácidos (QQSNTWPYT) o (QNDHSYPLT) o un equivalente de cada una de las mismas.

Ejemplos no limitantes del anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo incluyen un antagonista o agonista de PD-1 y/o un antagonista o agonista de PD-L1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente

de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1 y/o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un fragmento variable de cadena única (scFv, por sus siglas en inglés) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y/o uno equivalente de cada uno de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico. Ejemplos no limitantes del anticuerpo biespecífico incluyen las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada uno de los mismos y, opcionalmente un enlazador. Ejemplos adicionales no limitantes incluyen las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada una de las mismas y, opcionalmente un enlazador. Un ejemplo adicional incluye la región variable de

cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1 y un equivalente de cada una de las mismas y, opcionalmente un enlazador. Otro ejemplo adicional más incluye un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y/o un equivalente de cada uno de los mismos y, opcionalmente un enlazador.

También se proporciona en el presente documento una célula aislada que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o consiste en uno o más de los anticuerpos, los vectores y/o polinucleótidos aislados de cualquiera de las realizaciones anteriores, solos o en combinación entre sí. La célula puede ser una célula procariota o eucariota y opcionalmente se selecciona de una célula animal, una célula de mamífero, una célula bovina, una célula felina, una célula canina, una célula murina, una célula equina o una célula humana. En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula inmunitaria, opcionalmente un linfocito T, un linfocito B, una célula NK, una célula dendrítica, una célula mielóide, un monocito o un macrófago. En realizaciones adicionales, la célula inmunitaria es un linfocito T, que puede modificarse opcionalmente para suprimir la expresión de TCR endógeno, utilizando cualquier sistema apropiado, p.ej., un sistema CRISPR. En cualquiera de las realizaciones anteriores relacionadas con una célula aislada, la célula aislada expresa el CAR en la superficie celular y secreta el anticuerpo que

comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 o el fragmento de unión a antígeno del mismo, opcionalmente el anticuerpo biespecífico.

5 Otros aspectos adicionales se refieren a una composición que comprende uno cualquiera o más de los vectores y/o ácidos nucleicos aislados y/o células aisladas como se divulga en el presente documento y, opcionalmente, un transportador que es opcionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.

10 También se proporciona en el presente documento una composición que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en el ácido nucleico aislado o el vector, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno, el polipéptido, la célula aislada y/o la

15 población de células divulgadas en el presente documento y, opcionalmente, un transportador farmacéuticamente aceptable. En realizaciones adicionales, la composición comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, una cantidad eficaz de un inhibidor de FLT3. En

20 algunas realizaciones, la cantidad eficaz es una cantidad eficaz para aumentar la expresión superficial de FLT3 en células cancerosas o tumorales.

La presente divulgación también proporciona un complejo

25 aislado que comprende cualquiera de las células aisladas que expresan el CAR unida a: (i) una célula que expresa FLT3 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o un fragmento de los mismos y/o, (ii) FLT3 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o un fragmento de los mismos.

30 También se divulgan métodos para producir una célula que exprese CAR. Los métodos comprenden la transducción de una

célula aislada con un polinucleótido o un vector como se divulga en el presente documento. En algunas realizaciones, las células aisladas se seleccionan de un grupo que consiste en linfocitos T, linfocitos B, células NK, células dendríticas, células mieloides, monocitos o macrófagos. En algunas realizaciones, las células aisladas se seleccionan de un grupo que consiste en linfocitos T, linfocitos B, células NK, células dendríticas, células mieloides, monocitos o macrófagos. En realizaciones adicionales, las células aisladas son linfocitos T, que se modifican opcionalmente para suprimir la expresión de TCR endógeno. En realizaciones adicionales, las células aisladas son células NK. Las células pueden aislarse de cualquier especie apropiada, p.ej., mamíferos tal como una célula humana.

Las células que expresan CAR son útiles desde el punto de vista diagnóstico y terapéutico. En un aspecto, las células son útiles en un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa o un tumor, que expresan cada uno FLT3, opcionalmente en donde la célula es una célula de leucemia mieloide aguda (AML) con FLT3. La presente divulgación también se refiere a métodos para inhibir el crecimiento de un cáncer o tumor que expresa FLT3, opcionalmente leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto, que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en poner en contacto el cáncer o tumor con la célula aislada de o la composición de la presente divulgación. En un aspecto, el método para inhibir el crecimiento de un cáncer o tumor que expresa FLT3 en un sujeto, opcionalmente AML, comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en medir la expresión de PD-1 y/o PD-L1 en el sujeto y

administrar la célula aislada, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno y/o la composición de la presente divulgación a un sujeto que expresa PD-1 y/o PD-L1. En el presente documento se divulgan además métodos para inhibir el crecimiento de un

5 cáncer o tumor en un sujeto, opcionalmente AML, que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en medir la expresión de PD-1 y/o PD-L1 en el sujeto y administrar el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno y/o la composición a un sujeto que expresa

10 PD-1 y/o PD-L1. Los métodos pueden comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en poner en contacto la célula cancerosa o el tumor con cualquiera de las células aisladas o composiciones divulgadas en el presente documento anteriormente. El contacto puede ser

15 *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, el contacto es *in vivo* y las células aisladas son autólogas y/o alogénicas para un sujeto que se está tratando. En realizaciones adicionales, el método además comprende, o consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, administrar al

20 sujeto una cantidad eficaz de terapia citorreductora, que comprende opcionalmente o se selecciona del grupo que consiste en quimioterapia, crioterapia, hipertermia, terapia dirigida y/o radioterapia. En algunas realizaciones, el sujeto que se está tratando es un paciente humano.

25

En el presente documento se proporcionan además anticuerpos que comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente en, o que incluso consisten además en una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) que

30 comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia de

aminoácidos de (QVQLVQSGVEVKKPGASVKVS CKASGYTFTNYYMYWRQAPG
 QGLEWMGRVINPSNE SLQFDDTAVYYCARRDYRFDM GFDYWGQGTTVTVSSGGGGSG
 GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQDVSTAV
 AWYQQKPGKAPKLLIYSASFL YSGVPSRPGKAPKLLIYSASFL

5 YSGVPSRPDGS GSGSSLYSGVPSRPDGS GSGSHQKTFYKGVPSRDFGQRTFYTFYKTFDQR
 HQSGSHQGVPSRDQRDQLGSLYSGVPSRDFGKAPKAPKLLIYSASFL

YSGVPSRPDGS GLGSHQKTFYKGVPSRDVDQRTFGSGSHQKYQKPGKPGKAPKLLIYSAS

FL o un equivalente de las mismas. En un aspecto, el anticuerpo
 que comprende, o que de forma alternativa consiste
 10 esencialmente en, o que incluso consiste además en una
 secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) está
 codificado por la secuencia de nucleótidos que comprende, o
 que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que
 incluso consiste además en una secuencia del ácido nucleico

15 de:

(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT
 TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC
 CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA
 CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACCTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG
 20 GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC
 GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG
 TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC
 CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
 ATGTGTCAACCGCTGTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
 25 CTACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG
 ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC
 AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)

o un equivalente de la misma.

30 También se describen en el presente documento anticuerpos
 que comprenden, o que de forma alternativa consisten

esencialmente en, o que incluso consisten además en una
 secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) que
 comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente
 en, o que incluso consiste además en una secuencia de
 5 aminoácidos de:

(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGTLVTVSAGGG
 GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPR
 LLIYLAstyleSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLP LTFGGGTKVEI

10 K) o un equivalente de la misma.

En un aspecto, el anticuerpo comprende, o de forma
 alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste
 además en una secuencia de fragmento variable de cadena única
 15 (scFv) codificada por la secuencia de nucleótidos que
 comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente
 en, o que incluso consiste además en una secuencia del ácido
 nucleico de:

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
 20 TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCACCTACTATGC
 TGATTCAGTAAAAGGACGGTTCCTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
 CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC
 CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
 25 CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
 TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG
 TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
 30 ATTGCCAACATTCACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTGAAATAAA

A) o un equivalente de la misma.

También se describe en el presente documento un anticuerpo biespecífico que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia de aminoácidos de: (Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E W M G G I N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A Y M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K R) y/o (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LVTVSAGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPR LLIYLASYLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEI K) o un equivalente de cada una las mismas.

En un aspecto, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) codificada por la secuencia de nucleótidos que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia del ácido nucleico de: (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA

CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG
 GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC
 GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG
 TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC
 5 CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
 ATGTGTCAACCGCTGTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
 CTA CT CAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG
 ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTG CAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC
 AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)
 10 y/o
 (GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
 TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTATGC
 TGATT CAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
 15 CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC
 CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTG TGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
 CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
 20 TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG
 TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
 ATTGCCAACATTCACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA
 A) o un equivalente de las mismas.

25 El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgA, un IgD, un IgE,
 un IgM o un IgG. En un aspecto particular, el anticuerpo
 comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o
 incluso consiste además en una región constante. La región
 constante puede comprender, o de forma alternativa consistir
 30 esencialmente en, o incluso consistir además en una región
 constante de IgA, una de IgD, una de IgE, una de IgG o una de

IgM. En algunas realizaciones, la región constante es una región constante de IgG1 o una región constante de Ig kappa.

La presente divulgación también se refiere a anticuerpos que compiten por la unión con los anticuerpos descritos en el presente documento. El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal o humanizado. También se proporcionan en el presente documento los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de la presente divulgación. El fragmento de unión a antígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab', scFv y Fv. En un aspecto, el fragmento de unión a antígeno puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en una secuencia de aminoácidos de: (Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E W M G G I N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A Y M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K R) o un equivalente de cada una de las mismas. El fragmento de unión a antígeno puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia de un ácido nucleico de: (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG

GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC
 GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG
 TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC
 CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
 5 ATGTGTCAACCGCTGTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
 CTA CT CAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG
 ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC
 AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)

o un equivalente de cada una de las mismas.

10

En otro aspecto, el fragmento de unión a antígeno puede
 comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en,
 o incluso consistir además en una secuencia de aminoácidos de:

(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
 15 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSAGGG
 GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQKPGEAPR
 LLIYLA SYLES GVPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQHSRDLP LTFGGG TKVEI

K) o un equivalente de cada una de las mismas. El fragmento de
 unión a antígeno puede estar codificado por la secuencia de
 20 nucleótidos que comprende, o que de forma alternativa consiste
 esencialmente en, o que incluso consiste además en:

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
 TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCACCTACTATGC
 25 TGATT CAGTAAAAGGACGGTTC ACTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
 CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC
 CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
 CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
 30 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
 TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG

TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
ATTGCCAACATTACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA

A) o un equivalente de cada una de las mismas.

5 También se describen en el presente documento polipéptidos que comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente en, o que incluso consisten además en una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de:

(QVQLVQSGVEVKKPGASVKVS CKASGYTFTNYYMYWRQAPG
10 QGLEWMGGINPSNGGTNFNEK FKNRVTLTTDSSTTTAYMELK
SLQFDDTAVYYCARRDYRFDM GFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG
GGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQDVSTAV
AWYQQKPGKAPKLLIYSASFL YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQYLYHPA TFGQGTKVEIKR) o

15 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSAGGG
GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPR
LLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEI
K) o un equivalente de cada una de las mismas.

20

La presente divulgación se refiere además a ácidos nucleicos aislados que comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente en, o que incluso consisten además en una secuencia de los ácidos nucleicos de:

25 (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT
TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC
CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA
CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACCTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG
GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC
30 GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG
TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC

CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
ATGTGTCAACCGCTGTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
CTACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG
ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC
5 AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)
0
(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTATGC
10 TGATTCAAGTAAAAGGACGGTTCATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC
CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
15 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG
TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
ATTGCCAACATTCACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA
A) o un equivalente de cada una de las mismas.

20

En el presente documento se divulgan además métodos para preparar los anticuerpos de la presente divulgación.

También se proporcionan en el presente documento los
25 fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de la presente divulgación. En el presente documento se describen además polipéptidos que comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente en, o que incluso consisten además en una secuencia de aminoácidos de: (QVQLVQSGVEVKKPGASVKVS
30 CKASGYTFTNYYMYWVRQAPG QGLEWMGGINPSNGGTNFNEK
FKNRVTLTDSSTTTAYMELK SLQFDDTAVYYCARRDYRFDM

GFDYWGQGTTVTVSSGGGGSG

GGGSGGGGSDIQMTQSPSSL

ASVGDRVTITCRASQDVSTAV

AWYQQKPGKAPKLLIYSASFL

YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYLYHPA TFGQGTKVEIKR) o

(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY

5 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSAGGG

GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPR

LLIYLASYLESQVPAFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEI

K) o un equivalente de cada una de las mismas.

10 La presente divulgación se refiere además a ácidos nucleicos aislados que comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente en, o que incluso consisten además en una secuencia de los ácidos nucleicos de:

(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT

15 TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC

CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA

CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACCTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG

GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC

GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG

20 TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC

CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG

ATGTGTCAACCGCTGTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT

CTACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG

ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGACGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC

25 AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)

o

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG

TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC

CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGTTCCACCTACTATGC

30 TGATTCAGTAAAAGGACGGTTCCTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT

CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC

CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
 CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
 5 TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG
 TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
 ATTGCCAACATTACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA
 A) o un equivalente de cada una de las mismas.

10 También se divulgan en el presente documento kits que
 comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente
 en, o que consisten en una o más de las composiciones
 mencionadas anteriormente e instrucciones para su uso en los
 métodos como se divulga en el presente documento.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** muestra el diseño de CAR de FLT3 bicistrónico
 con anticuerpo biespecífico (biAb, por sus siglas en inglés)
 20 de PD-1-PD-L1 secretor. CAR de FLT3 estaba impulsado por el
 promotor $EF1\alpha$. El biAb de PD-1-PD-L1 estaba unido con CAR por
 T2A y dirigido por un péptido señal secretor (SS). Todo el
 casete estaba flanqueado por largas repeticiones terminales en
 una construcción lentivírica segura.

25

Las **FIGS. 2A-2C** muestran una citotoxicidad potenciada al
 reconocer las líneas celulares de AML FLT3(+). Actividad
 citotóxica de células NK-92 no modificadas, células NK-92 EV y
 células NK-92 con CAR de FLT3 contra: (**FIG. 2A**) células MOLM-
 30 13 FLT3(+), EOL-1 FLT3(+) o células U937 FLT3(-); (**FIG. 2B**)
 blastocitos de AML FLT3(+) de cada uno de dos pacientes

utilizando un ensayo de liberación de ^{51}Cr . Las células leucémicas diana se marcaron con ^{51}Cr y se cultivaron conjuntamente con células NK a las relaciones efector/diana (E/T, por sus siglas en inglés) indicadas en los pocillos de la placa de fondo en V de 96 pocillos a 37 °C durante 4 horas. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la liberación de ^{51}Cr en un contador TopCount (Canberra Packard). (**FIG. 2C**) Citotoxicidad de células NK con CAR de FLT3 primarias contra células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) normales definidas como CD34(+) y células dendríticas definidas como CD123(+) a partir de médula ósea de donantes sanos. Las células Topro3(+) se consideraron muertas.

Las **FIGS. 3A-3C** muestran que linfocitos T con CAR de FLT3 y células NK con FLT3 suprimen *in vivo* el crecimiento de AML humana y prolongan la supervivencia de ratones portadores de AML. Se inyectaron ratones NSG con células MOLM-13 FLT3(+) (**FIG. 3A**) o con blastocitos FLT3(+) de pacientes con AML (**FIG. 3B**). Una semana después, se inyectaron por vía intravenosa linfocitos T, linfocitos T con vector vacío o linfocitos T con CAR de FLT3. (**FIG. 3C**) Para células NK con CAR de FLT3, se inyectaron ratones NSG con células MOLM-13 FLT3(+) y se infundieron NK, NK con vector vacío o NK con CAR de FLT3 (mostrado en este caso como "CAR de FLT3" o PBS. Se trazaron curvas de Kaplan-Meier. Δ = CR continuo.

Las **FIGS. 4A-4D** muestran que las células NK con CAR de FLT-3 y las células NK primarias expandidas expresaron un alto nivel de PD-1. (**FIG. 4A**) Las células NK con CAR se cultivaron después de la transducción y se tiñeron para determinar el anticuerpo anti-PD-1. (**FIGS. 4B**) Las células NK primarias (sin

transducción de CAR) expresan PD1 en cultivo con IL-2, IL-15 e IL-21. La expresión de PD1 no fue necesaria para la transducción de CAR. (**FIGS. 4C y 4D**) Las líneas celulares de AML K562 y Molm-13 expresaron biAb anti-PD-1-anti-PD-L1. Los datos son de una ejecución representativa.

Las **FIGS. 5A-5B** muestran los niveles de secreción de la proteína de biAb anti-PD-1-anti-PD-L1 por linfocitos T transducidos con un vector con CAR de FLT3-biAb-anti-PD-1-anti-PD-L1. Los niveles de secreción se determinaron mediante ELISA usando un anticuerpo con etiqueta 6x-his 2 y 3 días después de la transducción. (**FIGS. 5A**). Curvas patrón de ELISA. Se muestran los datos de dos tiempos. (**FIGS. 5B**). Los niveles de secreción del biAb anti-PD-1-anti-PD-L1 de los linfocitos T transducidos con CAR de FLT3-biAb-anti-PD-1-anti-PD-L1 se detectaron mediante ELISA usando la etiqueta 6x-his mostrada. Se muestran los datos repetidos (rojo y azul) de dos tiempos. Los datos se recopilaron a partir de valores de DO 450nm basándose en la curva patrón que se muestra en la **FIG. 5A**.

Las **FIGS. 6A-6B** muestran niveles de secreción de linfocitos T transducidos con vectores con CAR de FLT3-anti-PD-1, CAR de FLT3-anti-PD-L1 o CAR de FLT3-biAb de-PD-1-PD-L1, determinados por ELISA usando anticuerpo con etiqueta 6x-his 5 días después de la transducción. (**FIG. 6A**) Curvas patrón de ELISA. Se muestran los datos de dos tiempos. (**FIG. 6B**) Niveles de secreción de anti-PD-1, anti-PD-L1 o biAb de PD-1-PD-L1 por linfocitos T transducidos con un vector con CAR de FLT3-anti-PD-1, CAR de FLT3-anti-PD-L1, o CAR de FLT3-biAb-anti-PD-1-anti-PD-L1, respectivamente. Los niveles de secreción se determinaron mediante ELISA usando el anticuerpo con etiqueta

6x-his mostrado. Se muestran datos de tres donantes diferentes (24, 25, 26, 27).

La **FIG. 7** muestra infección y purificación de linfocitos T con CAR de FLT3 que expresan anti-PD-L1, anti-PD-1, biAb anti-PD-1- anti-PD-L1, o detectado por citometría de flujo después de que las células se tiñeran con anti-Fab contra CAR. Se muestran los datos de un donante representativo.

Las **FIGS. 8A-8B** indican los resultados de los ensayos de destrucción basados en flujo de cuatro horas, que mostró que los linfocitos T con CAR de FLT3-anti-PD-1 purificados mantienen niveles de citotoxicidad como los linfocitos T con CAR de FLT3 purificados. (**FIG. 8A**) Se utilizaron como células diana dos líneas de células tumorales de AML FLT3(+) y una línea de células tumorales de AML FLT3(-). Todas las células tumorales se trataron previamente con tiente fluorescente AM. Las células se seleccionaron en función de células diana de AML y las células positivas para Sytox Blue (eje Y) representan la capacidad de destrucción de las células tumorales. (**FIG. 8B**) Sumario de datos de la **FIG. 8A** con tres relaciones E:T (efector:diana).

La **FIG. 9** muestra que el Ab(por sus siglas en inglés) anti-PD-1 secretado por los linfocitos T con CAR de FLT3 anti-PD-1 aumenta la viabilidad de los linfocitos T con CAR de FLT3. La columna de color gris muestra los linfocitos T estimulados de donantes sanos sin tratar. La columna de color negro muestra linfocitos T con CAR de FLT3 (como control negativo). La columna de color verde claro muestra linfocitos T con CAR de FLT3 cultivados con sobrenadante que contiene Ab anti-PD-1

secretado (15 ng/ml). La columna de color verde claro con patrón rayado muestra linfocitos T con CAR de FLT3 tratados previamente con un sobrenadante que contiene 15 ng/ml de Ab anti-PD-1 secretado, incubados con 10 µg/ml de proteína de fusión PD-1 durante 30 minutos. La columna verde oscuro muestra linfocitos T con CAR de FLT3 cultivados con Ab anti-PD-1 (BD Biosciences, como control positivo). Las columnas de color azul muestran linfocitos T con CAR de FLT3-anti-PD-1 cultivados con sobrenadante que contiene Ab anti-PD-1 secretado (15 ng/ml). La columna de color azul con patrón rayado muestra linfocitos T con CAR de FLT3-anti-PD-1 cultivados con un sobrenadante que contiene 15 ng/ml de Ab anti-PD-1 secretado e incubados con 10 µg/ml de proteína de fusión PD-1 durante 30 minutos. Los datos se resumen de 7 donantes. La proliferación celular se evaluó como ensayos MTT.

La **FIG. 10** muestra la cuantificación de la expresión de FLT3 en la superficie en las líneas celulares de AML, MOLM-13, U937, THP-1, MV4-11 y EOL-1 tratadas con control de vehículo o los siguientes inhibidores de FLT3 durante 48 horas: midostaurina 10 µM, FF-10101 10 µM, quizartinib 10 µM (AC220) o dovitinib 10 µM (TKI-258). Los datos muestran que en la mayoría de los casos, la expresión de la densidad de superficie de FLT3 aumentó después del tratamiento con un inhibidor de FLT3.

La **FIG. 11** representa la cuantificación de la expresión de densidad de superficie de FLT3 mediante citometría de flujo en blastocitos de AML antes y después de tratarse con midostaurina durante 48 horas. La figura muestra que la expresión de la densidad de superficie de FLT3 en los

blastocitos de AML se reguló positivamente después del tratamiento.

La **FIG. 12** representa el mecanismo propuesto de las células NK con CAR de FLT3 anti-PD-1-anti-PD-L1 y linfocitos T con CAR de FLT3 anti-PD-1-anti-PD-L1 que interactúan con un blastocito de AML FLT3(+) y que secretan biAb anti-PD-1-anti-PD-L1 que bloquea la interacción PD1-PD-L1 entre el linfocito T y/o la célula NK PD-1(+) y el blastocito leucémico PD-L1(+).

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Debe entenderse que la presente divulgación no se limita a los aspectos particulares descritos, ya que estos pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para los fines de describir aspectos particulares únicamente y no pretende ser limitante, debido a que el alcance de la presente divulgación estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece esta tecnología. Aunque puede usarse cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente tecnología, se describen a continuación los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Todas las publicaciones técnicas y de patentes citadas en el presente documento se incorporan en el presente

25

30

documento como referencia en su totalidad. No ha de interpretarse que nada en el presente documento constituya una admisión de que la presente tecnología no tenga derecho a anteponer dicha divulgación por virtud de una divulgación anterior.

La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo de tejidos, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que se encuentran entre las habilidades de la técnica. Véanse, p.ej., Green and Sambrook eds. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4ª edición; the series Ausubel *et al.* eds. (2015) *Current Protocols in Molecular Biology*; the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson *et al.* (2015) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson *et al.* (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; McPherson *et al.* (2006) *PCR: The Basics* (Garland Science); Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Greenfield ed. (2014) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 6ª edición; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Pat. de Estados Unidos N.º 4.683.195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Herdewijn ed. (2005) *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Buzdin and Lukyanov ed. (2007) *Nucleic Acids Hybridization: Modern Applications*; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Grandi ed. (2007) *In Vitro Transcription and Translation Protocols*, 2ª Edición; Guisan ed. (2006) *Immobilization of*

Enzymes and Cells; Perbal (1988) A Practical Guide to Molecular Cloning, 2ª Edición; Miller and Calos eds, (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian
5 Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Lundblad and Macdonald eds. (2010) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 4ª edición; y Herzenberg *et al.* eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology, 5ª edición.

10

Todas las designaciones numéricas, p.ej., pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo los intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 1,0 o 0,1, según sea apropiado, o de
15 forma alternativa mediante una variación de +/- 15 %, o de forma alternativa 10 %, o de forma alternativa 5 %, o de forma alternativa 2 %. Se debe entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas estén precedidas por el término "aproximadamente". También se debe
20 entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en el presente documento son simplemente ilustrativos y que los equivalentes de los mismos se conocen en la técnica.

25

Debe deducirse, sin que se cite de manera explícita y, a menos que se pretenda lo contrario, que cuando la presente tecnología se refiere a un polipéptido, proteína, polinucleótido o anticuerpo, se pretende que un equivalente o un equivalente biológico de los mismos esté dentro del alcance
30 de la presente tecnología.

Definiciones

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero no excluye a otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará excluir otros
15 elementos de importancia esencial para la combinación para el uso previsto. Por ejemplo, una composición que consista esencialmente en los elementos como se define en el presente documento no excluiría los contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y los transportadores
20 farmacéuticamente aceptables, tal como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "Que consiste en" significará excluir más que los elementos traza de otros ingredientes y etapas sustanciales del método para administrar las composiciones divulgadas en el presente documento. Los
25 aspectos definidos por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a organismos vertebrados multicelulares vivos, una
30 categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término "mamífero" incluye mamíferos tanto humanos como no

humanos.

Los términos "sujeto", "hospedador" "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a sujetos humanos y veterinarios, por ejemplo, seres humanos, animales, primates no humanos, perros, gatos, ovejas, ratones, caballos y vacas. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere colectivamente a inmunoglobulinas o moléculas similares a inmunoglobulinas que incluyen a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, cabras, conejos y ratones, así como especies no de mamíferos, tal como las inmunoglobulinas de tiburón. A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas intactas y "fragmentos de anticuerpos" o "fragmentos de unión a antígeno" que se unen específicamente a una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés muy similares) con la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que tienen una constante de unión para la molécula de interés que es al menos 10^3 M^{-1} mayor, al menos 10^4 M^{-1} mayor o al menos 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión para otras moléculas en una muestra biológica). El término "anticuerpo" también incluye formas genéticamente modificadas tal como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos o humanizados no primates), anticuerpos heteroconjugados (tal como, anticuerpos

biespecíficos). Véanse también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Owen *et al.*, Kuby Immunology, 7^a Ed., W.H. Freeman & Co., 2013; Murphy, Janeway's Immunobiology, 8^a Ed., Garland Science, 2014; Male
5 *et al.*, Immunology (Roitt), 8^a Ed., Saunders, 2012; Parham, The Immune System, 4^a Ed., Garland Science, 2014.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo producido
10 por un solo clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de cadena ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, preparando células híbridas formadoras de anticuerpos
15 a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias de bazo. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

En términos de estructura de anticuerpos, una
20 inmunoglobulina tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases (o isotipos) principales de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD,
25 IgG, IgA e IgE. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable, (las regiones también se conocen como "dominios"). En combinación, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se combinan para unirse específicamente al antígeno. Las regiones variables de
30 las cadenas ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también

denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". La extensión de la región marco y las CDR se han definido (véase, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, 5 que se incorpora por referencia en el presente documento). La base de datos de Kabat se mantiene en línea. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco 10 combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, adopta en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que se conectan y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Por tanto, las regiones marco actúan formando un armazón que posibilita el posicionamiento 15 de las CDR en la orientación correcta mediante interacciones intercadena no covalentes.

Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan 20 normalmente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo aminoterminal y también se identifican normalmente por la cadena en la que se encuentra la CDR en particular (regiones de cadena pesada marcadas con CDHR y regiones de cadena ligera marcadas con CDLR). Por tanto, 25 una CDHR3 es la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDLR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Un anticuerpo de FLT3 tendrá una secuencia exclusiva de la región V_H y de la región V_L 30 específicas para el antígeno FLT3 y, por tanto, secuencias CDR específicas. Anticuerpos con diferentes especificidades (es

decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de un anticuerpo a otro anticuerpo, solamente un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están directamente implicadas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan restos determinantes de la especificidad (SDR, por sus siglas en inglés).

Como se usa en el presente documento, el término "PD-1" se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos el 70 %, o de forma alternativa al menos el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, o de forma alternativa 90 % de identidad de secuencia, o de forma alternativa al menos el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de PD-1 como se muestra en el presente documento y/o un compañero de unión adecuado de PD-L1. En el presente documento se proporcionan secuencias ejemplo no limitantes de PD-1, tales como, pero sin limitación, aquellas bajo los siguientes números de referencia - GCID: GC02M241849; HGNC: 8760; Entrez Gene: 5133; Ensembl: ENSG00000188389; OMIM: 600244; y UniProtKB: Q15116 - y la secuencia:

MQIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSE
SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYL
CGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVG VVGLLGSLVL
LVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPE
QTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL y equivalentes de las mismas.

30

Ejemplos no limitantes de anticuerpos disponibles

comercialmente incluyen pembrolizumab (Merck), nivolumab (Bristol-Myers Squibb), pidilizumab (Cure Tech), AMP-224 (GSK), AMP-514 (GSK), PDR001 (Novartis) y cemiplimab (Regeneron y Sanofi).

5

Como se usa en el presente documento, el término "PD-L1" se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos el 70 %, o de forma alternativa al menos el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, o de forma alternativa 90 % de identidad de secuencia, o de forma alternativa al menos el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de PD-L1 como se muestra en el presente documento y/o un compañero de unión adecuado de PD-1.

15 En el presente documento se proporcionan secuencias ejemplo no limitantes de PD-L1, tal como, pero sin limitación, los que se encuentran bajo los siguientes números de referencia: GCID: GC09P005450; HGNC: 17635; Entrez Gene: 29126; Ensembl: ENSG00000120217; OMIM: 605402; y UniProtKB: Q9NZQ7 - y la
20 secuencia:

MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMED
KNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGAD
YKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTN
SKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVIL

25 GAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET y equivalentes de las mismas. Ejemplos no limitantes de anticuerpos disponibles comercialmente incluyen atezolizumab (Roche Genentech), avelumab (Merck Soreno y Pfizer), durvalumab (AstraZeneca), BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) y CK-301
30 (Checkpoint Therapeutics).

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a un compuesto, composición, o sustancia que puede estar unida específicamente por los productos de inmunidad humoral o celular específicas, tal como una molécula de anticuerpo o un receptor de linfocitos T. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermedios simples, azúcares (p.ej., oligosacáridos), lípidos y hormonas, así como macromoléculas tal como carbohidratos complejos (p.ej., polisacáridos), fosfolípidos y proteínas. Las categorías comunes de antígenos incluyen, pero sin limitación, antígenos víricos, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y otros parasitarios, antígenos tumorales, antígenos implicados en enfermedades autoinmunitarias, alergia y rechazo de injertos, toxinas y otros antígenos diversos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio de unión a antígeno" se refiere a cualquier dominio de proteína o polipeptídico que puede unirse específicamente a un antígeno diana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que puede unirse a dos tipos diferentes de antígenos, p.ej., tiene dos dominios de unión a antígeno diferentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "péptido señal" se refiere a una secuencia peptídica que dirige el transporte y la localización de la proteína dentro de una célula, p.ej., a un determinado orgánulo celular (tal como el retículo endoplásmico) y/o a la superficie celular. En el

presente documento se divulgan ejemplos no limitantes de un péptido señal, p.ej., el péptido codificado por la siguiente secuencia de un ácido nucleico:

Secuencia de péptido señal:

5 ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC y,
opcionalmente, un equivalente de la misma.

Secuencia de péptido señal:

MGWSCIIILFLVATATGVHS y, opcionalmente, un equivalente de la
10 misma.

Secuencia de péptido señal:

MDWIWRILFLVGAATGAHS y, opcionalmente, un equivalente de la
misma.

15

Como se usa en el presente documento, la expresión "unión específica" significa el contacto entre un anticuerpo y un antígeno con una afinidad de unión de al menos 10^{-6} M. En determinados aspectos, los anticuerpos se unen con afinidades
20 de al menos aproximadamente 10^{-7} M y preferentemente 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, o 10^{-12} M.

En un aspecto, las expresiones "equivalente" o "equivalente biológico" de un anticuerpo significa la capacidad
25 del anticuerpo para unirse selectivamente a su proteína epítipo o fragmento de la misma medida por ELISA u otros métodos adecuados. Los anticuerpos biológicamente equivalentes incluyen, pero sin limitación, esos anticuerpos, péptidos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpos, derivados
30 de anticuerpos y miméticos de anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia.

Debe deducirse, sin que se cite de manera explícita y, a menos que se pretenda lo contrario, que cuando la presente divulgación se refiere a un polipéptido, proteína, polinucleótido o anticuerpo, se pretende que un equivalente o un equivalente biológico de los mismos esté dentro del alcance de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, la expresión "equivalente biológico del mismo o de la misma" pretende ser sinónimo de "equivalente del mismo o de la misma" cuando se hace referencia a una proteína, anticuerpo, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa de referencia, pretende aquellos que tienen una homología mínima mientras mantienen la estructura o funcionalidad deseada. A menos que se cite específicamente en el presente documento, se contempla que cualquier polinucleótido, polipéptido o proteína mencionado en el presente documento también incluye equivalentes de los mismos. Por ejemplo, un equivalente significa al menos aproximadamente un 70 % de homología o identidad, o al menos un 80 % de homología o identidad y, de forma alternativa, o al menos aproximadamente un 85 %, o de forma alternativa al menos aproximadamente un 90 %, o de forma alternativa al menos aproximadamente un 95 %, o de forma alternativa un 98 % de homología o identidad y muestra una actividad biológica sustancialmente equivalente a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa de referencia. De forma alternativa, al referirse a polinucleótidos, un equivalente de los mismos es un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido de referencia o su complemento.

Como se usa en el presente documento, el término "autólogo", en referencia a células se refiere a células que

se aíslan y se vuelven a infundir en el mismo sujeto (receptor u hospedador). "Alogénico" se refiere a células no autólogas.

El término "aislado" como se usa en el presente documento se refiere a moléculas o materiales biológicos o celulares que están sustancialmente libres de otros materiales. En un aspecto, el término "aislado" se refiere a un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, o proteína o polipéptido (p. ej., un anticuerpo o derivado del mismo), o una célula o un orgánulo celular, o un tejido u órgano, separados de otros ADN o ARN, o proteínas o polipéptidos, o células u orgánulos celulares, o tejidos u órganos, respectivamente, que están presentes en la fuente natural. El término "aislado" también se refiere a un ácido nucleico o péptido que está sustancialmente libre de material celular, material vírico o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente. Además, se entiende que un "ácido nucleico aislado" incluye fragmentos de un ácido nucleico que no son de origen natural tal como fragmentos y no se encontraría en el estado natural. El término "aislado" también se usa en el presente documento para referirse a polipéptidos que se aíslan de otras proteínas celulares y pretende abarcar tanto polipéptidos purificados como recombinantes. El término "aislado" también se usa en el presente documento para referirse a células o tejidos que se aíslan de otras células o tejidos y pretende abarcar tanto células o tejidos cultivados como modificados por ingeniería.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula aislada" generalmente se refiere a una célula que está

sustancialmente separada de otras células de un tejido.

Las "células inmunitarias" incluyen, p.ej., glóbulos blancos (leucocitos) que derivan de células madre hematopoyéticas (HSC) producidas en la médula ósea, linfocitos (linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales (NK)) y células de origen mieloide (neutrófilo, eosinófilo, basófilo, monocito, macrófago, células dendríticas).

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula NK", también conocida como linfocito citolítico natural, se refiere a un tipo de linfocito que se origina en la médula ósea y desempeña un papel crítico en el sistema inmunitario innato. Las células NK proporcionan respuestas inmunitarias rápidas
15 contra las células infectadas por virus, células tumorales u otra célula estresada, incluso en ausencia de anticuerpos y del complejo principal de histocompatibilidad en las superficies celulares. Las células NK pueden aislarse u obtenerse de una fuente disponible comercialmente. Ejemplos no
20 limitantes de líneas de células NK comerciales incluyen las líneas NK-92 (ATCC® CRL-2407™), NK-92MI (ATCC® CRL-2408™). Otros ejemplos incluyen pero sin limitación, las líneas NK HANK1, KHYG-1, NKL, NK-YS, NOI-90 e YT. Las fuentes ilustrativas no limitantes para dichas líneas celulares
25 disponibles comercialmente incluyen la American Type Culture Collection, o ATCC, (atcc.org/) y la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (dsmz.de/).

Como se usa en el presente documento, la expresión "
30 linfocito B", se refiere a un tipo de linfocito en la inmunidad humoral del sistema inmunitario adaptativo. Los linfocitos B

funcionan principalmente para producir anticuerpos, sirven como células presentadoras de antígenos, liberan citocinas y desarrollan linfocitos B de memoria después de la activación por interacción con el antígeno. Los linfocitos B se distinguen de otros linfocitos, tal como los linfocitos T, por la presencia de un receptor de linfocitos B en la superficie celular. Los linfocitos B pueden aislarse u obtenerse de una fuente disponible comercialmente. Ejemplos no limitantes de líneas de linfocitos B disponibles comercialmente incluyen las líneas AHH-1 (ATCC® CRL-8146™), BC-1 (ATCC® CRL-2230™), BC-2 (ATCC® CRL-2231™), BC-3 (ATCC® CRL-2277™), CA46 (ATCC® CRL-1648™), DG-75 [D.G.-75] (ATCC® CRL-2625™), DS-1 (ATCC® CRL-11102™), EB-3 [EB3] (ATCC® CCL-85™), Z-138 (ATCC n.º CRL-3001), DB (ATCC CRL-2289), Toledo (ATCC CRL-2631), Pfiffer (ATCC CRL-2632), SR (ATCC CRL-2262), JM-1 (ATCC CRL-10421), NFS-5 C-1 (ATCC CRL-1693); NFS-70 C10 (ATCC CRL-1694), NFS-25 C-3 (ATCC CRL-1695), AND SUP-B15 (ATCC CRL-1929). Otros ejemplos incluyen, pero sin limitación, líneas celulares derivadas de linfomas anaplásicos y de células grandes, p.ej., DEL, DL-40, FE-PD, JB6, Karpas 299, Ki-JK, Mac-2A Ply1, SR-786, SU-DHL-1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10 y -16, DOHH-2, NU-DHL-1, U-937, Granda 519, USC-DHL-1, RL; linfomas de Hodgkin, p.ej., DEV, HD-70, HDLM-2, HD-MyZ, HKB-1, KM-H2, L 428, L 540, L1236, SBH-1, SUP-HD1, SU/RH-HD-1. Las fuentes ilustrativas no limitantes para dichas líneas celulares disponibles comercialmente incluyen la American Type Culture Collection, o ATCC, (atcc.org/) y la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>).

Como se usa en el presente documento, La expresión "linfocito T", se refiere a un tipo de linfocito que madura en

el timo. Los linfocitos T desempeñan un papel importante en la inmunidad mediada por células y se distinguen de otros linfocitos, tales como los linfocitos B, por la presencia de un receptor de linfocitos T en la superficie celular. Los

5 linfocitos T pueden bien aislarse u obtenerse de una fuente disponible comercialmente. "Linfocito T" incluye todos los tipos de células inmunitarias que expresan CD3, incluyendo linfocitos T auxiliares (células CD4+), linfocitos T citotóxicos (células CD8+), linfocitos T citolíticos

10 naturales, linfocitos T reguladores (Treg) y linfocitos T gamma-delta. Una "célula citotóxica" incluye linfocitos T CD8+, linfocitos citolíticos naturales (NK) y neutrófilos, siendo capaces estas células de mediar respuestas de citotoxicidad. Ejemplos no limitantes de líneas de linfocitos T disponibles

15 comercialmente incluyen las líneas Jurkat BCL2 (AAA) (ATCC® CRL-2902™), Jurkat BCL2 (S70A) (ATCC® CRL-2900™), Jurkat BCL2 (S87A) (ATCC® CRL-2901™), Jurkat BCL2 (ATCC® CRL-2899™), Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™), línea de linfocitos T humanos citotóxicos TALL-104 (ATCC n.º CRL-11386). Otros ejemplos

20 incluyen, pero sin limitación, líneas de linfocitos T maduros, p.ej., tal como Deglis, EBT-8, HPB-MLp-W, HUT 78, HUT 102, Karpas 384, Ki 225, My-La, Se-Ax, SKW-3, SMZ-1 y T34; y líneas de linfocitos T inmaduros, p.ej., ALL-SIL, Be13, CCRF-CEM, CML-T1, DND-41, DU.528, EU-9, HD-Mar, HPB-ALL, H-SB2, HT-1, JK-T1,

25 Jurkat, Karpas 45, KE-37, KOPT-K1, K-T1, L-KAW, Loucy, MAT, MOLT-1, MOLT 3, MOLT-4, MOLT 13, MOLT-16, MT-1, MT-ALL, P12/Ichikawa, Peer, PER0117, PER-255, PF-382, PFI-285, RPMI-8402, ST-4, SUP-T1 a T14, TALL-1, TALL-101, TALL-103/2, TALL-104, TALL-105, TALL-106, TALL-107, TALL-197, TK-6, TLBR-1, -2,

30 -3 y -4, CCRF-HSB-2 (CCL-120.1), J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153), J45.01 (ATCC CRL-1990), J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063), RS4;11 (ATCC

CRL-1873), CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119); y líneas de linfoma cutáneo de linfocitos T, p.ej., HuT78 (ATCC CRM-TIB-161), MJ[G11] (ATCC CRL-8294), HuT102 (ATCC TIB-162). Las líneas celulares de leucemia nula, incluyendo, pero sin limitación, 5 REH, NALL-1, KM-3, L92-221, son otra fuente disponible comercialmente de células inmunitarias, al igual que las líneas celulares derivadas de otras leucemias y linfomas, tales como K562 de eritroleucemia, THP-1 de leucemia monocítica, U937 de linfoma, HEL de eritroleucemia, HL60 de leucemia, HMC-1 de 10 leucemia, KG-1 de leucemia, U266 de mieloma. Las fuentes ilustrativas no limitantes para dichas líneas celulares disponibles comercialmente incluyen la American Type Culture Collection, o ATCC, (<http://www.atcc.org/>) y la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures 15 (<https://www.dsmz.de/>).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "secuencia de un ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de 20 nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por tanto, esta expresión incluye, pero sin limitación, ADN o ARN mono, bi o multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases de 25 nucleótidos naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas.

El término "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente y en su sentido más amplio para referirse a un 30 compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades se pueden unir

mediante enlaces peptídicos. En otro aspecto, la subunidad se puede unir mediante otros enlaces, p.ej., éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se impone ninguna limitación sobre el número máximo de aminoácidos que pueden comprender una secuencia de proteína o de péptido. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina y los isómeros ópticos tanto D como L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína recombinante" se refiere a un polipéptido que se produce mediante técnicas de ADN recombinante, en donde generalmente, el ADN que codifica el polipéptido se inserta en un vector de expresión adecuado que a su vez se usa para transformar un linfocito T hospedador para producir la proteína heteróloga.

Un polinucleótido o región polinucleotídica (o un polipéptido o región polipeptídica) que tiene un determinado porcentaje (por ejemplo, 80 %, 85 %, un 90 % o un 95 %) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando están alineadas, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds. 1987) Supplement 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, se usan parámetros predeterminados para la alineación. Un programa de

alineación preferido es BLAST, usando parámetros predeterminados. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros predeterminados: código genético= patrón; filtro = ninguno; hebra = ambas; valor de corte = 60; expectativa = 10; Matriz= BLOSUM62; Descripciones=50 secuencias; clasificación por= PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos=no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura-tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no-limitantes de polinucleótidos: un gen o un fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARNi, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácidos nucleicos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, pueden impartirse modificaciones a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede estar

interrumpida por componentes no-nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. El término también se refiere a moléculas tanto-bicatenarias como-monocatenarias. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier aspecto de la presente tecnología que sea un polinucleótido abarca tanto la forma-bicatenaria como cada una de las dos formas complementarias-monocatenarias conocidas o predichas para formar la forma-bicatenaria.

Como se usa en el presente documento, la expresión "expresión" se refiere al proceso mediante el cual los polinucleótidos se transcriben en ARNm y/o el proceso mediante el cual el ARNm transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARNm en una célula eucariota. El nivel de expresión de un gen puede determinarse midiendo la cantidad de ARNm o proteína en una muestra de célula o tejido. En un aspecto, el nivel de expresión de un gen de una muestra puede compararse directamente con el nivel de expresión de ese gen de una muestra de referencia o de control. En otro aspecto, el nivel de expresión de un gen de una muestra puede compararse directamente con el nivel de expresión de ese gen de la misma muestra después de la administración de un compuesto.

Como se usa en el presente documento, el término "sobreexpresar" con respecto a una célula, un tejido u órgano expresa una proteína en una cantidad que es mayor que la cantidad que se produce en una célula de control, un elemento

de control, o un órgano. Una proteína que se sobreexpresa puede ser endógena a la célula hospedadora o exógena a la célula hospedadora.

5 Como se usa en el presente documento, el término "CRISPR" se refiere a una técnica de manipulación genética específica de secuencia que se basa en la ruta de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas. CRISPR se puede utilizar para realizar edición de genes y/o
10 regulación de genes, así como simplemente dirigir las proteínas a una ubicación genómica específica. La edición de genes se refiere a un tipo de ingeniería genética en el que la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido diana se cambia mediante la introducción de eliminaciones, inserciones o sustituciones
15 de bases en la secuencia del polinucleótido. En algunos aspectos, la edición de genes mediada por CRISPR utiliza las vías de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o recombinación homóloga para realizar las ediciones. La regulación génica se refiere a aumentar o disminuir la producción de productos
20 génicos específicos tal como proteínas o ARN.

El término "ARNg" o "ARN guía", como se usa en el presente documento, se refiere a las secuencias de ARN guía que se usan para dirigirse a genes específicos para su corrección empleando
25 la técnica CRISPR. Las técnicas de diseño de ARNg y polinucleótidos terapéuticos del donante para la especificidad de diana son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, Doench, J., *et al.* Nature biotechnology 2014; 32(12):1262-7, Mohr, S. *et al.* (2016) FEBS Journal 283: 3232-38 y Graham, D., *et al.*
30 Genome Biol. 2015; 16: 260. El ARNg comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste

además en un polinucleótido de fusión que comprende ARN CRISPR (ARNcr) y ARN CRISPR trans-activador (ARNtracr); o un polinucleótido que comprende ARN CRISPR (ARNcr) y ARN CRISPR trans-activador (ARNtracr). En algún aspecto, un ARNg es sintético (Kelley, M. *et al.* (2016) *J of Biotechnology* 233 (2016) 74-83). Como se usa en el presente documento, un equivalente biológico de un ARNg incluye, pero sin limitación, polinucleótidos o moléculas diana que pueden guiar un Cas9 o equivalente del mismo a una secuencia de nucleótidos específica, tal como una región específica del genoma de una célula.

La expresión "secuencia consenso" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos o de un ácido nucleico que se determina alineando una serie de secuencias múltiples y que define una secuencia idealizada que representa la elección predominante de aminoácido o base en cada posición correspondiente de la múltiples secuencias. Dependiendo de las secuencias de la serie de múltiples secuencias, la secuencia consenso para la serie puede diferir de cada una de las secuencias en cero, una, unas pocas o más sustituciones. También, dependiendo de las secuencias de la serie de múltiples secuencias, se puede determinar más de una secuencia consenso para la serie. La generación de secuencias consenso se ha sometido a un análisis matemático intensivo. Se pueden utilizar varios programas informáticos para determinar una secuencia consenso.

El término "codificar" tal como se aplica a las secuencias de los ácidos nucleicos se refiere a un polinucleótido que se dice que "codifica" un polipéptido si, en su estado natural o

cuando se manipula mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia, se puede transcribir y/o traducir para producir el ARNm del polipéptido y/o un fragmento del mismo. La hebra antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico y la secuencia codificante puede deducirse de la misma.

Como se usa en el presente documento en referencia a un polinucleótido regulador, la expresión "unido operativamente" se refiere a una asociación entre el polinucleótido regulador y la secuencia polinucleotídica a la que está unido de manera que, cuando una proteína específica se une al polinucleótido regulador, se transcribe el polinucleótido unido.

Las secuencias o elementos reguladores incluyen promotores, potenciador y/o combinaciones promotor/potenciador. El promotor que regula la expresión del ácido nucleico que codifica puede ser un promotor constitutivo. Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos incluyen SFFV, CMV, PKG, MDNU3, SV40, Ef1a, UBC y CAGG. En un aspecto, el potenciador es un elemento postregulador de Woodchuck ("WPRE, por sus siglas en inglés") (véase, p.ej., Zufferey, R. *et al.* (1999) *J. Virol.* 73(4):2886-2992). El elemento potenciador puede estar cadena abajo del promotor.

El término "promotor" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier secuencia que regula la expresión de una secuencia codificante, tal como un gen. Los promotores pueden ser constitutivos, inducibles, reprimibles, o específicos de tejido, por ejemplo. Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia polinucleotídica en la que se controla el inicio y la velocidad

de la transcripción. Puede contener elementos genéticos a los que se pueden unir proteínas y moléculas reguladoras, tales como la ARN polimerasa y otros factores de transcripción.

5 Como se usa en el presente documento, el término "potenciador", como se usa en el presente documento, indica elementos de secuencia que aumentan, favorecen o mejoran la transcripción de una secuencia de un ácido nucleico independientemente de su ubicación y orientación en relación
10 con la secuencia de un ácido nucleico a expresar. Un potenciador puede potenciar la transcripción de un solo promotor o simultáneamente de más de un promotor. Siempre que esta funcionalidad de mejorar la transcripción se conserve o se conserve sustancialmente (p. ej., al menos un 70 %, al menos
15 un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de la actividad de tipo silvestre, es decir, la actividad de una secuencia completa), cualquier variante truncada, mutada o modificada de otra manera de una secuencia potenciadora de tipo silvestre también están dentro de la definición anterior.

20

 Como se usa en el presente documento, "homología" o "idéntico", porcentaje de "identidad" o "similitud", cuando se usa en el contexto de dos o más secuencias de los ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o
25 subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de restos de nucleótidos o aminoácidos que son iguales, p.ej., al menos un 60 % de identidad, preferentemente al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, un 99 % o mayor identidad en
30 una región específica (p. ej., la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento o la

secuencia de aminoácidos de un anticuerpo descrito en el presente documento). La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear a efectos de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds. 1987) Supplement 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, se usan parámetros predeterminados para la alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, usando parámetros predeterminados. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros predeterminados: código genético= patrón; filtro = ninguno; hebra = ambas; valor de corte = 60; expectativa = 10; Matriz= BLOSUM62; Descripciones=50 secuencias; clasificación por= PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos=no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. Los términos "homología" o "idéntico", porcentaje de "identidad" o "similitud" también se refieren, o pueden aplicarse al complemento de una secuencia de prueba. Los términos también incluyen secuencias que tienen eliminaciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones. Como se describe en el presente documento, los algoritmos preferidos pueden tener en cuenta huecos y

similares. Preferentemente, existe identidad a lo largo de una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferentemente, a lo largo de una región que tiene 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40 % de identidad, o de forma alternativa menos del 25 % de identidad, con una de las secuencias divulgadas en el presente documento.

10 "Hibridación" se refiere a una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de los restos de nucleótidos. El enlace de hidrógeno se puede producir mediante el emparejamiento de bases de Watson Crick, 15 unión de Hoogstein, o de cualquier otra forma específica de secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura de doble hebra, tres o más cadenas que forman un complejo de múltiples cadenas, una única cadena de autohibridación, o cualquier combinación de éstas. Una reacción 20 de hibridación puede constituir una etapa en un proceso más extenso, tal como el inicio de una reacción de PCR o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima.

Ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas 25 incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C; concentraciones de tampón de hibridación de aproximadamente 6x SSC a aproximadamente 10x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 0 % a aproximadamente 25 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 30 4x SSC a aproximadamente 8x SSC. Ejemplos de condiciones de hibridación moderadas incluyen: temperaturas de incubación de

aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 9x SSC a aproximadamente 2x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 30 % a aproximadamente 50 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 5x SSC a aproximadamente 2x SSC. Ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55 % a aproximadamente 75 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0,1x SSC, o agua desionizada. En general, los tiempos de incubación de hibridación son de 5 minutos a 24 horas, con 1, 2 o más etapas de lavado y los tiempos de incubación del lavado son de aproximadamente 1, 2 o 15 minutos. SSC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM. Se entiende que se pueden emplear equivalentes de SSC usando otros sistemas tampón.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula inmunorreguladora" puede referirse a cualquier molécula que pueda regular o influir directamente en las respuestas inmunitarias, incluyendo pero sin limitación las quimiocinas tales como CCL2, CCL5, CCL14, CCL19, CCL20, CXCL8, CXCL13 y LEC; linfocinas y citocinas tales como interleucinas (p. ej., IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, etc.), interferones α , β y γ , factores que estimulan el crecimiento celular (p. ej., GM-CSF) y otros factores (p. ej., factores de necrosis tumoral, DC-SIGN, M1P1 α , M1P1 β , TGF- β o TNF); factores que proporcionan señales coestimuladoras para la activación de linfocitos T, tal como las moléculas B7 y CD40; moléculas accesorias tal como CD83; proteínas implicadas en el procesamiento y presentación de antígenos tal como las

proteínas transportadoras TAP1/TAP2, moléculas de proteosomas tal como LMP2 y LMP7, proteínas de choque térmico tal como gp96, HSP70 y HSP90 y moléculas MHC o HLA; y equivalentes biológicos de los mismos. En el presente documento se divulgan
5 ejemplos no limitantes de moléculas inmunorreguladoras.

Como se usa en el presente documento, el término "B7.1" (también conocido como B7; BB1; B7-1; CD80; LAB7; CD28LG; CD28LG1) se refiere a una molécula específica asociada con este
10 nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con B7.1. En el presente documento
15 se proporcionan ejemplos de la secuencia de B7.1. Además, las secuencias asociadas con los números de acceso de GenBank NM_005191.3 y NP_005182.1 son ilustrativas. Un ejemplo no limitante incluye NP_005182.1:

MGHTRRQGTS	PSKCPYLNFF	QLLVLAGLSH	FCSGVIHVTK	EVKEVATLSC
20 GHNVSVEELA	QTRIYWQKEK	KMVLTMMSGD	MNIWPEYKNR	TIFDITNNLS
IVILALRPSD	EGTYECVVLK	YEKDAFKREH	LAEVTL SVKA	DFPTPSISDF
EIPTSNIIRRI	ICSTSGGFPE	PHLSWLENGE	ELNAINTTVS	QDPETELYAV
SSKLDFNMTT	NHSFMCLIKY	GHLRVNQTFN	WNTTKQEHFP	DNLLPSWAIT
LISVNGIFVI	CCLTYCFAPR	CRERRRNERL	RRESVRPV	

25 En algunas realizaciones en las que B7.1 se administra como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores
30 de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas. Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el

Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents
(<http://www.linscottsdirectory.com/>).

Como se usa en el presente documento, el término "CCL19"
5 (también conocido como ELC; CKb11; MIP3B; MIP-3b; SCYA19) se
refiere a una molécula específica asociada con este nombre y
cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga
que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de
aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia,
10 más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia
con CCL19. En el presente documento se proporcionan ejemplos
de la secuencia de CCL19. Además, las secuencias asociadas con
los números de acceso de GenBank NC_000009.11 NC_018920.2
NT_008413.19, NP_006265.1 son ilustrativas. Un ejemplo no
15 limitante incluye NP_006265.1:

```
MALLLALSLL VLWTSPAPTL SGTNDAEDCC LSVTQKPIPG YIVRNFHYLL  
IKDGCRVPAV VFTTLRGRQL CAPPDQPWVE RIIQRLQRTS AKMKRRSS
```

En algunas realizaciones en las que CCL19 se administra
20 como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir
en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes
incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores
de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas.
Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el
25 Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents
(<http://www.linscottsdirectory.com/>).

Como se usa en el presente documento, el término "CCL20"
(también conocido como CKb4; LARC; ST38; MIP3A; Exodus; MIP-
30 3a; SCYA20; MIP -3,) se refiere a una molécula específica
asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga

una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con CCL20. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia de CCL20. Además, las secuencias asociadas con los números de acceso de GenBank NC_000002.11 NC_018913.2 NT_005403.18, NP_001123518.1 y NP_004582.1 son ilustrativas. Ejemplos no limitantes incluyen NP_004582.1:

10 MCCTKSLLLA ALMSVLLLHL CGESEAASNF DCCLGYTDRI LHPKFIVGFT
RQLANEGCDI NAIIFHTKKK LSVCANPKQT WVKYIVRLLS KVKNM

y NP_001123518.1:

MCCTKSLLLA ALMSVLLLHL CGESEASNFD CCLGYTDRIL HPKFIVGFTR
QLANEGCDIN AIIFHTKKKL SVCANPKQTW VKYIVRLLSK KVKNM

15

En algunas realizaciones en las que CCL20 se administra como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas. Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (véase la dirección web: linscottsdirectory.com, última consulta el 20 de junio de 2019).

25

Como se usa en el presente documento, el término "CD40L" (también conocido como IGM; IMD3; TRAP; gp39; CD154; CD40LG; HIGM1; T-BAM; TNFSF5; hCD40L) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos,

30

preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con CD40L. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia de CD40L. Además, las secuencias asociadas con los
5 números de acceso de GenBank NC_000023.10, NC_018934.2, NT_011786.17, NP_000065.1 son ilustrativas. Un ejemplo no limitante incluye NP_000065.1:

```
MIETYNQTSP   RSAATGLPIS   MKIFMYLLTV   FLITQMIGSA   LFAVYLHRRRL
DKIEDERNLH   EDFVFMKTIQ   RCNTGERSLS   LLNCEEIKSQ   FEGFVKDIML
10 NKEETKKENS   FEMQKGDQNP   QIAAHVISEA   SSKTTSVLQW   AEKGYTMSN
NLVTLENGKQ   LTVKRQGLYY   IYAQVTFCNS   REASSQAPFI   ASLCLKSPGR
FERILLRAAN   THSSAKPCGQ   QSIHLGGVFE   LQPGASVFN   VTDPSQVSHG
TGFTSFGLLK L
```

15 En algunas realizaciones en las que CD40L se administra como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas.
20 Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (véase la dirección web en linscottsdirectory.com, última consulta el 20 de junio de 2019).

25 Como se usa en el presente documento, el término "CD137L" (también conocido como TNFSF9; 4-1BB-L) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos,
30 preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con

CD137L. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia de CD137L. Además, las proteínas asociadas con los números de acceso de GenBank NC_000019.9, NT_011295.12, NC_018930.2 y NP_003802.1 son ilustrativas. Un ejemplo no limitante incluye NP_003802.1:

```
MEYASDASLD    PEAPWPPAPR    ARACRVLPWA    LVAGLLLLLLL    LAAACAVFLA
CPWAVSGARA    SPGSAASPRL    REGPELSPDD    PAGLLDLRQG    MFAQLVAQNV
LLIDGPLSWY    SDPGLAGVSL    TGGLSYKEDT    KELVVAKAGV    YYVFFQLELR
RVVAGEGSGS    VSLALHLQPL    RSAAGAAALA    LTVDLPPASS    EARNSAFGFQ
GRLHLHSAGQ    RLGVLHTEA    RARHAWQLTQ    GATVLGLFRV    TPEIPAGLPS    PRSE
```

En algunas realizaciones en las que CD137L se administra como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas. Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (véase la dirección web en: linscottsdirectory.com, última consulta el 20 de junio de 2019).

Como se usa en el presente documento, el término "GITRL" (también conocido como TNFSF18; TL6; AITRL; hGITRL) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con GITRL. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia de GITRL. Además, las proteínas asociadas con los números de acceso de GenBank NC_000001.10, NC_018912.2,

NT_004487.20 y NP_005083.2 son ilustrativas. Un ejemplo no limitante incluye NP_005083.2:

```

MTLHPSPITC   EFLFSTALIS   PKMCLSHLEN   MPLSHSRTQG   AQRSSWKLWL
FCSIVMLLFL   CSFSWLIFIF   LQLETAKEPC   MAKFGPLPSK   WQMASSEPPC
5  VNKVSDWKLE   ILQNGLYLIY   GQVAPNANYN   DVAPFEVRLY   KNKDMIQTLT
NKSKIQNVGG   TYELHVGDTI   DLIFNSEHQV   LKNNTYWGII   LLANPQFIS

```

En algunas realizaciones en las que se administra GITRL como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas. Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (véase la dirección web en linscottsdirectory.com, última consulta el 20 de junio de 2019).

Como se usa en el presente documento, el término "GM-CSF" (también conocido como factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; CSF2) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con GM-CSF. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia GM-CSF. Además, la secuencia de proteínas asociada con el N.º de referencia de UniProt P04141 - CSF2_HUMAN:

```

30  MWLQSLLLLG   TVAC SISAPA   RSPSPSTQPW   EHVNAIQEAR   RLLNLSRDTA
AEMNETVEVI   SEMFDLQEPT   CLQTRLELYK   QGLRGSLTKL   KGPLTMMASH

```

En algunas realizaciones en las que se administra GM-CSF como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas. Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (<http://www.linscottsdirectory.com>).

Como se usa en el presente documento, el término "IL-12" (también conocido como "interleucina 12") se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con IL-12. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia de IL-12 e incluyen, pero sin limitación, la forma madura de IL-12 y variantes y fragmentos de la misma, tal como IL-12 monocatenaria, IL-12A (números de acceso de GenBank NC_000003.11 NT_005612.17 NC_018914.2) e IL-12B (números de acceso de GenBank NC_000005.9 NC_018916.2 NT_023133.14). Las secuencias de proteínas asociadas con las secuencias divulgadas en la patente de Estados Unidos n.º 8.556.882 son ilustrativas. En algunas realizaciones en las que IL-12 se administra como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas. Se puede

encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (<http://www.linscottsdirectory.com>).

5 Como se usa en el presente documento, el término "IL-2" (también conocido como "interleucina 2") se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, 10 preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con IL-2. Un ejemplo no limitante, a continuación, proporciona la secuencia de longitud completa de IL-2 humana natural:

APTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	YKNPKLTRML	TFKFYMPKKA
15 TELKHLQCLE	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHL	RPRDLISNIN	VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT				

La expresión "IL-2 de baja toxicidad" se refiere a una versión modificada de IL-2 que muestra una función biológica 20 análoga pero menor toxicidad cuando se administra a un sujeto. En algunas realizaciones, la IL-2 de baja toxicidad comprende una mutación con permeabilidad vascular reducida en comparación con la IL-2 de tipo silvestre. La patente de Estados Unidos n.º 7.371.371 divulga mutaciones ilustrativas en la región 25 potenciadora de la permeabilidad de la IL-2 de tipo silvestre entre las posiciones de aminoácidos 22 a 58 de la IL-2 humana. Ejemplos no limitantes incluyen una mutación de R a W en la posición 38 de la secuencia humana. La patente de Estados Unidos n.º 7.371.371 divulga además la IL-2 de baja toxicidad 30 que comprende una mutación en una o más posiciones fuera de la región potenciadora de la permeabilidad de IL-2.

Como se usa en el presente documento, el término "IL-15" (también conocido como "interleucina 15") se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con IL-15. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia de IL-15. Además, las secuencias de proteínas asociadas con los números de acceso de GenBank NC_000004.11, NC_018915.2, NT_016354.20, NP_000576.1, NP_751915.1 son ilustrativas. En algunas realizaciones en las que IL-15 se administra como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas. Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (véase linscottsdirectory.com, mencionado anteriormente).

Como se usa en el presente documento, el término "IL-18" (también conocido como "interleucina 18", IGIF, "Interleucina 1 gamma" IL1F4, factor inductor de IFN-gamma, IL-1 g,) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con IL-18. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia de IL-18. Además, las secuencias de proteínas

asociadas con los números de acceso de GenBank NC_000011.9, NC_018922.2, NT_033899.9, NP_001230140.1, NP_001553.1 son ilustrativas. En algunas realizaciones en las que IL-18 se administra como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas. Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (véase linscottsdirectory.com, mencionado anteriormente).

Como se usa en el presente documento, el término "IL-21" (también conocido como "interleucina 21"; Za11; CVID11) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con IL-21. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia de IL-21. Además, las secuencias de proteínas asociadas con los números de acceso de GenBank NC_000004.11, NC_018915.2, NT_016354.20, son ilustrativas. En algunas realizaciones en las que IL-21 se administra como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas. Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (véase linscottsdirectory.com, mencionado anteriormente).

Como se usa en el presente documento, el término "LEC" (también conocido como CCL16; LMC; NCC4; CKb12; HCC-4; LCC-1; Mtn-1; NCC-4; SCYL4; ILINCK; SCYA16) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con LEC. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia de LEC. Además, las secuencias de proteínas asociadas con los números de acceso de GenBank NC_000017.10, NT_010783.16, NT_187614.1, NC_018928.2, NP_004581.1 son ilustrativas. Un ejemplo no limitante incluye NP_004581.1:

```

MKVSEAAALSL  LVLILIITSA  SRSQPKVPEW  VNT PSTCCLK  YYEKVLPRRL
VVG YRKALNC  HLP AII FVTK  RNREVCTNPN  DDWVQEYIKD  PNL PLLPTRN
LST VKIITAK  NGQPQLLSQ

```

En algunas realizaciones en las que se administra LEC como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Dichas fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas. Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (véase linscottsdirectory.com, mencionado anteriormente).

Como se usa en el presente documento, el término "OX40L" (también conocido como TNFSF4; GP34; CD252; TXGP1; CD134L; OX-40L) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad

de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con OX40L. En el presente documento se proporcionan ejemplos de la secuencia de OX40L. Además, las

5 secuencias de proteínas asociadas con los números de acceso de GenBank NC_000001.10, NT_004487.20, NC_018912.2, NP_003317.1 son ilustrativas.

Un ejemplo no limitante incluye NP_003317.1: MERVQPLEEN

10 VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ
 SIKVQFTEYK KEGGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS
 QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL
 DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL

15 En algunas realizaciones en las que OX40L se administra como parte de una composición, se puede sintetizar o adquirir en cualquier fuente comercial disponible. Tales fuentes incluyen, Santa Cruz Biosciences, Origene y otros vendedores de proteínas purificadas y versiones modificadas de las mismas.

20 Se puede encontrar una lista de fuentes comerciales en el Linscott's Directory of Immunological & Biological Reagents (véase linscottsdirectory.com, mencionado anteriormente).

Como se usa en el presente documento, el término "FLT3"

25 se refiere a una proteína tirosina cinasa de tipo receptor FLT3 asociada con este nombre, cualquiera de sus nombres alternativos (tirosina cinasa relacionada con Fms, tirosina cinasa de células madre, tirosina cinasa similar a Fms, receptor de citocinas FL, antígeno CD135, EC 2.7.10.1, CD135,

30 FLK-2, STK1, FLK2, tirosina cinasa receptora del factor de crecimiento de tipo III, tirosina-proteína cinasa tipo receptor

FLT3, cinasa hepática fetal 2, cinasa-2 hepática fetal, EC 2.7.10, FLT-3, STK-1) o número de acceso de UniProt P36888 y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, o de forma alternativa al menos un 95 % de identidad de secuencia con FLT3 y cualquier variante o isoforma de la misma. Ejemplos no limitantes de FLT3 incluyen:

10 La isoforma 1 de FLT3 humana,
 MPALARDGGQLPLLVSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNDSSVGKSSSYPMVSESPE
 DLGCALRPQSSGTVYEAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFDLQN
 RGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALV
 CISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECTRL
 15 FTIDLNQTPQTTLPLQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEGNYFEMSTYST
 NRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSSEDYEIDQYEE
 FCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGEYIFHAENDDAQF
 TKMFTLNIRRKPVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKAN
 RKVFGQWSSSTLNMSEAIKGLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPIQDNISFYATIG
 20 VCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYFYVDFREYEYDLKWEFPRENL
 EFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEKADSSEREALMSELKMMTQLGSH
 ENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLSKREKFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSH
 PNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIEYENQKRLEEEEDLNVLT FEDLLCFAY
 QVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVKICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKW
 25 MAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLGVNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYAT
 EEIYIIMQSCWAFDSRKRPSPNLTSFLGCQLADAEAMYQNV DGRVSECPHTYQNRPFPS
 REMDLGLLSPQAQVEDS y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

La isoforma 2 de FLT3 humana:

30 MPALARDGGQLPLLVSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNDSSVGKSSSYPMVSESPE
 DLGCALRPQSSGTVYEAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFDLQN

RGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALV
 CISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECTRL
 FTIDLNQTPQTTLPLQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEGNYFEMSTYST
 NRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSSEDYEIDQYEE
 5 FCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHHKHQPGEYIFHAENDDAQF
 TKMFTLNIRRKPVLAEASASQASCFSQGYPLPSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKAN
 RKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPIQDNISFYATIG
 VCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYFYVDFREYEDLKWEFPRENL
 EFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEKADSSEREALMSELKMMTQLGSH
 10 ENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRKREKFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSH
 PNSSMPGSREVQIHPDSQISGLHGNSFHSEDEIEYENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAY
 QVAKGMEFLEFKSARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLGVNPYPGIPVD
 ANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLGCQLADAEEMYQ
 NVDGRVSECPHTYQNRPFPSREMDLGLLSPQAQVEDS y, opcionalmente, un
 15 equivalente de la misma.

Como se usa en el presente documento, el término FLT3-1
 se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de
 aminoácidos con CDR que comparten al menos un 70 %, o de forma
 20 alternativa al menos un 80 % de identidad de secuencia de
 aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia,
 más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia
 con cualquiera de las CDR codificadas en las secuencias
 polinucleotídicas de cadena pesada y ligera divulgadas a
 25 continuación en el presente documento, preferentemente al menos
 una de las regiones CDR3, lo más preferentemente ambas regiones
 CDR3, divulgadas a continuación. Las secuencias de aminoácidos
 de dichas regiones CDR también se divulgan a continuación en
 el presente documento.

30

Secuencia de región variable de cadena pesada de FLT3-1:

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCATTGAAGCTGT
 CCTGCAAGTCTTCCGGGTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGAGGCC
 TGGACATGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGACAGTTATAAAGACTACAAT
 CAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTGGACAGATCCTCCAACACAGCCTACATGC
 5 ACCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGAGCGATTACGAC
 GACCCCTTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA y,
 opcionalmente, un equivalente de la misma.

Secuencia de región variable de cadena ligera de FLT3-1:

10 GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTC
 TTTCTGTCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACA
 TGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGG
 TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGACTGAAG
 ATTTTGGAGTGTATTTCTGTCAACAGAGTAACACCTGGCCGTACACGTTCCGAGGGGGGAC
 15 CAAGCTGGAAATAAAACGG y, opcionalmente, un equivalente de la
 misma.

CDHR1 de FLT3-1:

SYWMH y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

20

CDHR2 de FLT3-1:

EIDPSDSYKDYNQKFKD y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

CDHR3 de FLT3-1:

25 AITTTPDFD y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

CDLR1 de FLT3-1:

RASQSI>NNLH y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

30

CDLR2 de FLT3-1:

YASQSI y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

CDLR3 de FLT3-1:

QQSNTWPYT y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Como se usa en el presente documento, el término FLT3-2
 5 se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de
 aminoácidos con CDR que comparten al menos un 70 %, o de forma
 alternativa al menos un 80 % de identidad de secuencia de
 aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia,
 más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia
 10 con cualquiera de las CDR codificadas en las secuencias
 polinucleotídicas de cadena pesada y ligera divulgadas a
 continuación en el presente documento, preferentemente al menos
 una de las regiones CDR3, lo más preferentemente ambas regiones
 CDR3, divulgadas a continuación. Las secuencias de aminoácidos
 15 de dichas regiones CDR también se divulgan a continuación en
 el presente documento.

Secuencia de región variable de cadena pesada de FLT3-2:

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCA
 20 CCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAATACTATGGTTTACACTGGGTTCGCCAGTCTCC
 AGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGAAGCACAGACTATAATGCA
 GCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAA
 TGAACAGTCTGCAGGCTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAAAAGGAGGGATCTA
 CTATGCTAACCATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC
 25 TCA y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Secuencia de región variable de cadena ligera de FLT3-2:

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTA
 TGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAAGAACTATATGGCCTG
 30 GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACTAGGGAA
 TCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTTCACTCTTACCATCA

GCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTATCCGCT
CACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG y, opcionalmente, un
equivalente de la misma.

5 CDHR1 de FLT3-2:

NYGLH y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

CDHR2 de FLT3-2:

VIWSGGSTDYNAAFIS y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

10

CDHR3 de FLT3-2:

GGIYYANHYYAMDY y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

CDLR1 de FLT3-2:

15 KSSQSLLNSGNQKNYM y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

CDLR2 de FLT3-2:

GASTRES y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

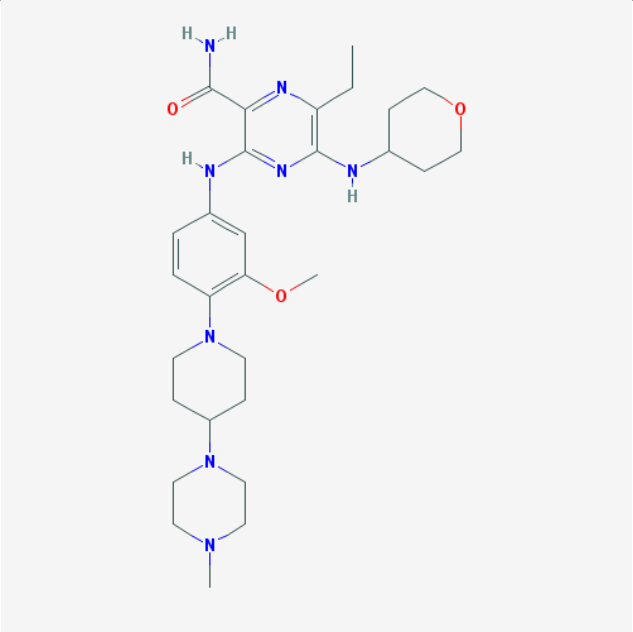
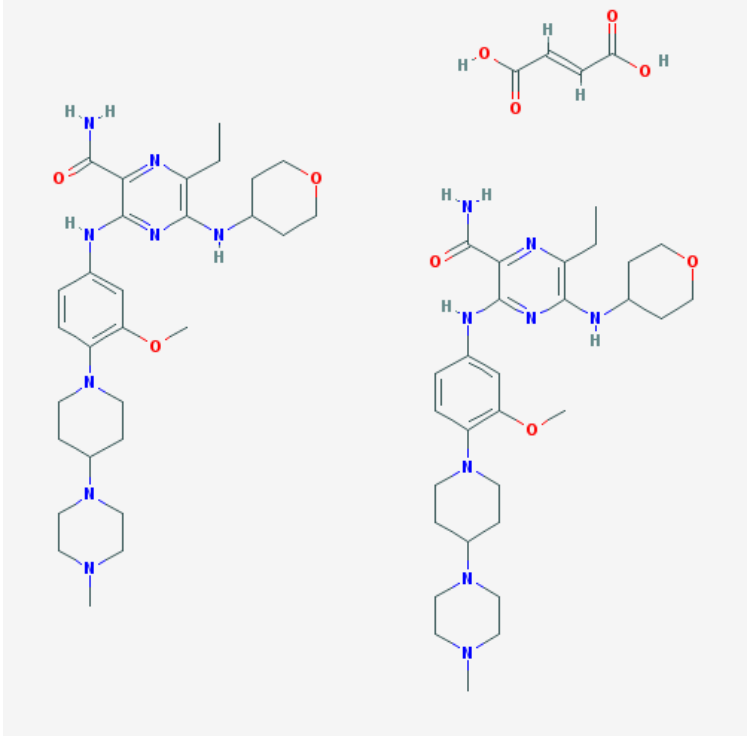
20 CDLR3 de FLT3-2:

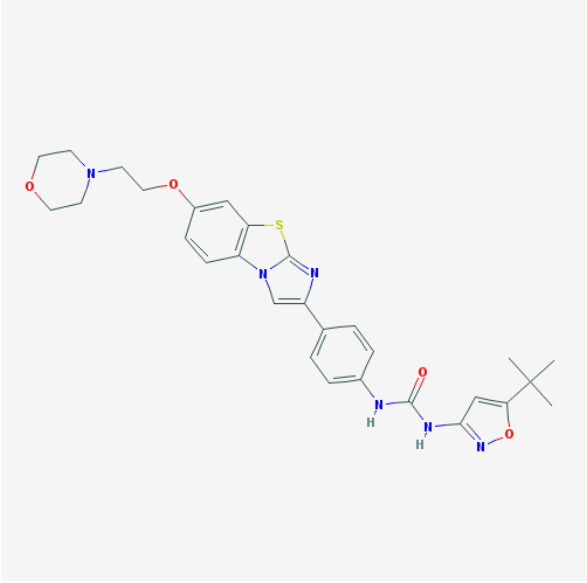
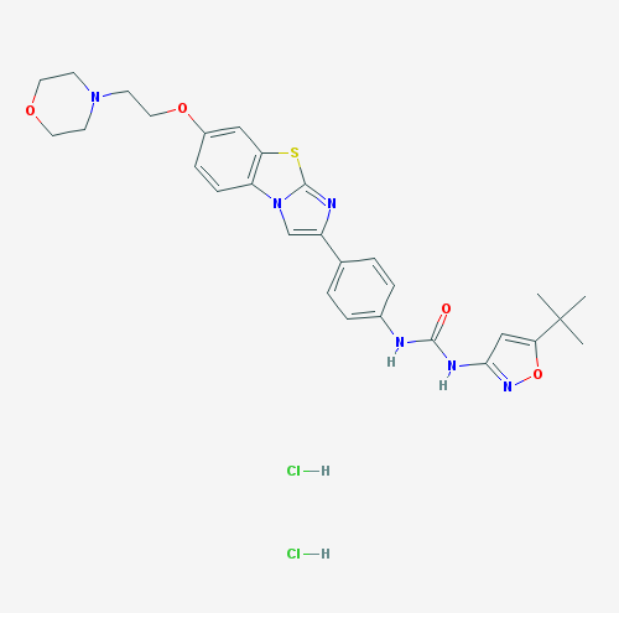
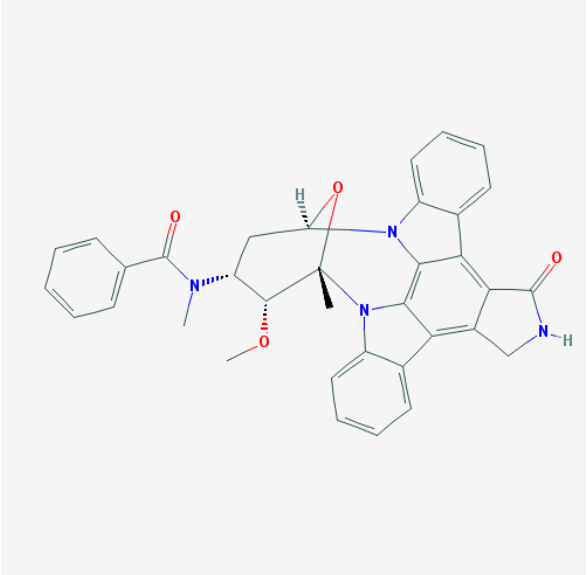
QNDHSYPLT y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

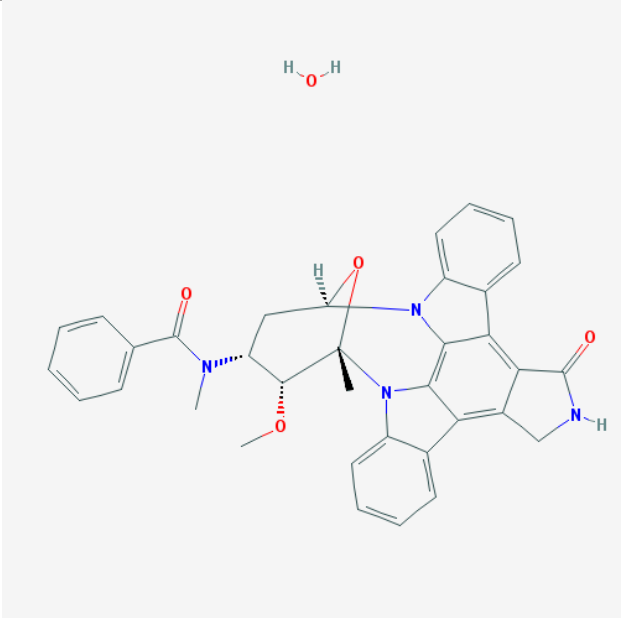
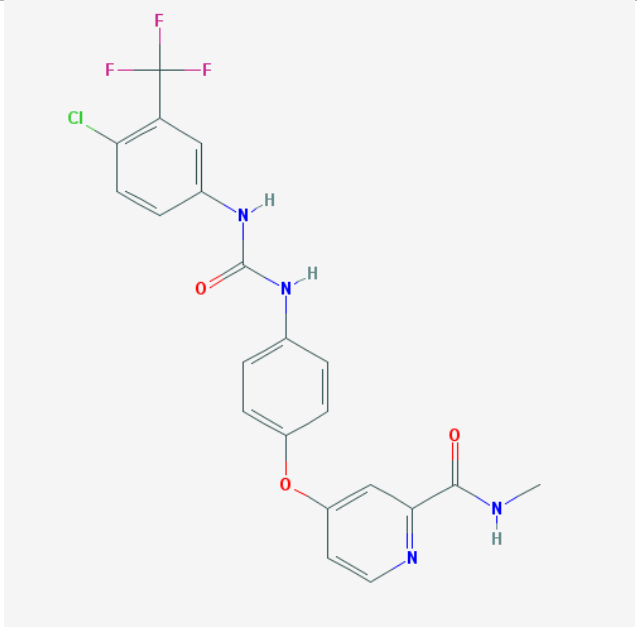
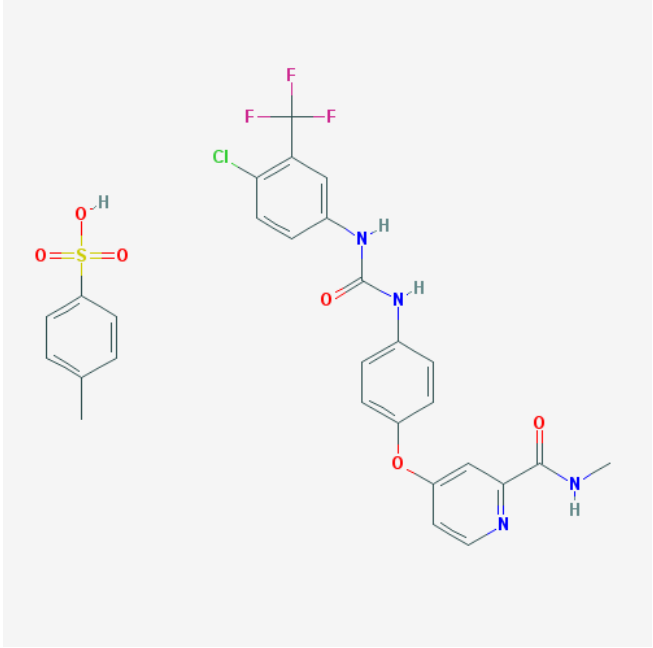
Como se usa en el presente documento, la expresión
"inhibidor de FLT3" se refiere a una molécula que se une a FLT3
25 y disminuye su actividad. Sin quedar unidos a la teoría, se
cree que tales inhibidores de FLT3 pueden aumentar la expresión
de FLT3 en la superficie en las células. Ejemplos no limitantes
de inhibidores de FLT3 incluyen gilteritinib (Astellas),
quizaritinib (Ambit Biosciences), midostaurina (Novartis),
30 sorafenib (Bayer y Onxy Pharmaceuticals), sunitinib (Pfizer),
lestarutinib (Cephalon), FF-10101 (Fuijfilm), dovitinib

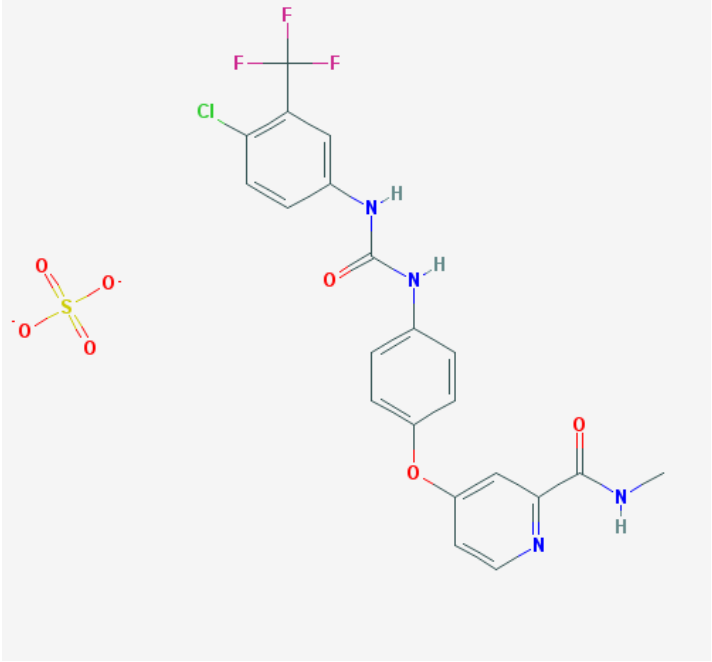
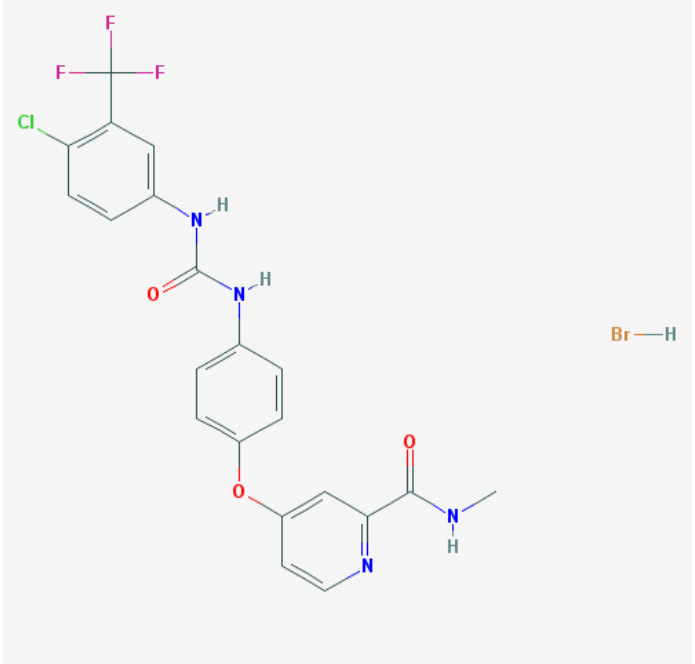
(Novartis u Oncology Venture) y equivalentes de los mismos tales como, pero sin limitación, sales e hidratos. En el presente documento, a continuación, se proporcionan estructuras ilustrativas para algunos de estos inhibidores de

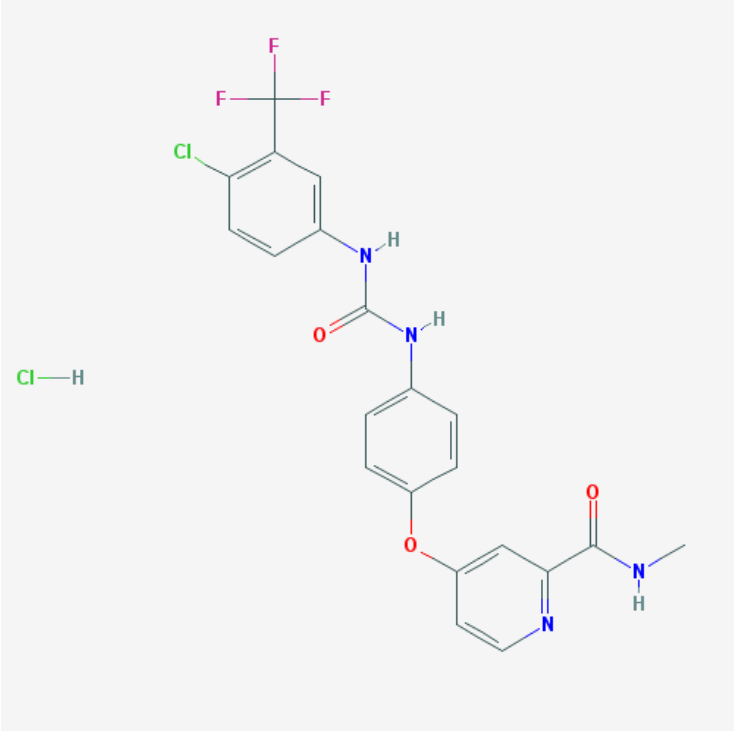
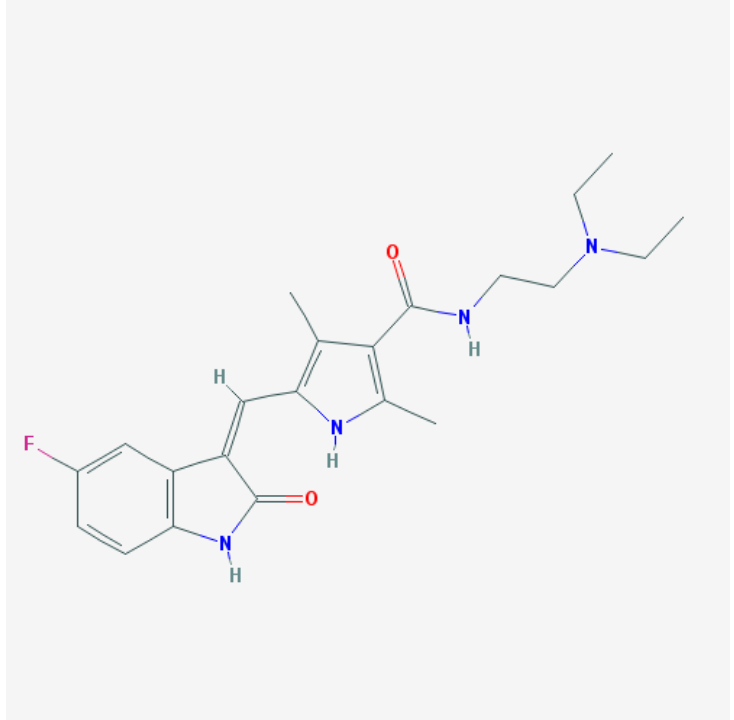
5 FLT3 ilustrativos:

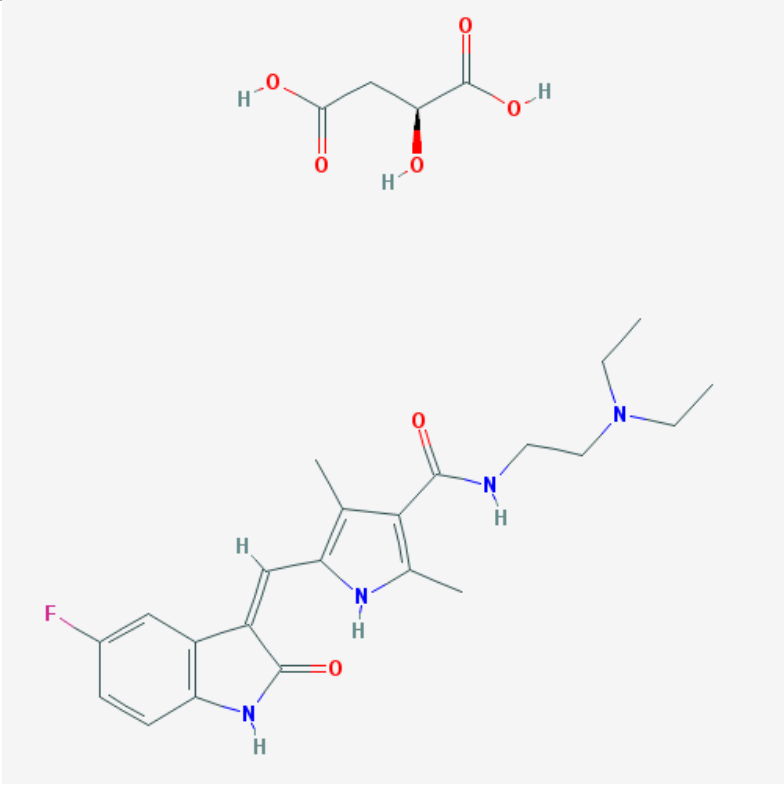
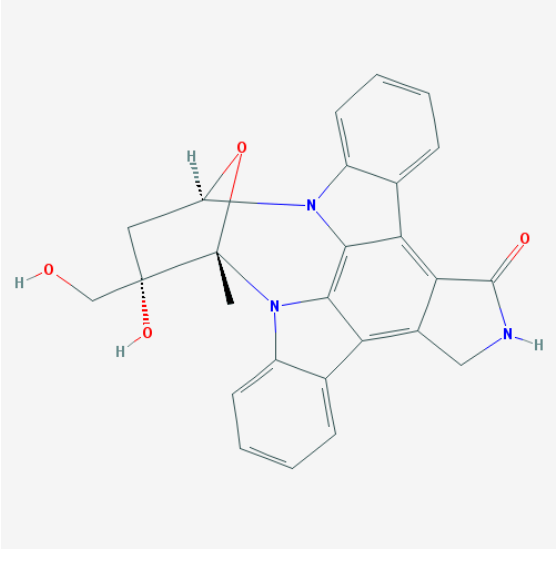
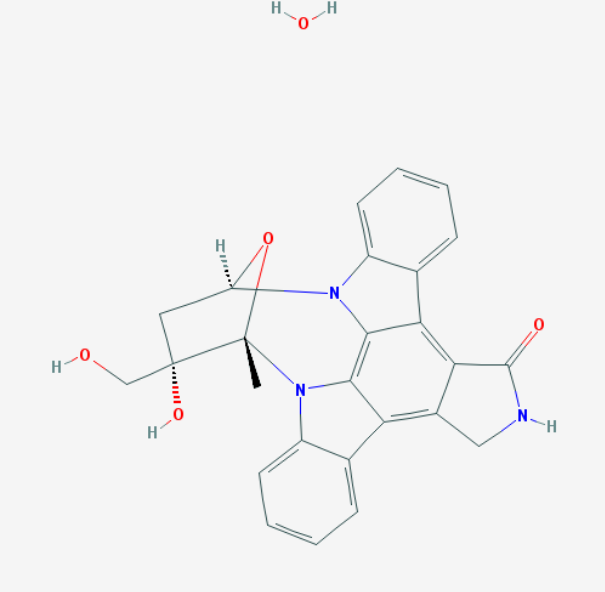
Nombre del compuesto	Estructura química
Gilteritinib (CID 49803313)	 The chemical structure of Gilteritinib is shown. It features a central pyrimidine ring substituted with a morpholine group, a methyl group, and a carboxamide group. This pyrimidine is linked via its nitrogen to a 4-methoxyphenyl ring, which is further connected to a piperidine ring, and finally to a dimethylpiperazine ring.
Fumarato de gilteritinib (CID 76970819)	 The chemical structure of the Fumarate salt of Gilteritinib is shown. It consists of the Gilteritinib cation (as described above) and a fumarate anion. The fumarate anion is depicted as a trans-butenedioate ion, with the structure $\text{H}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{H}$.

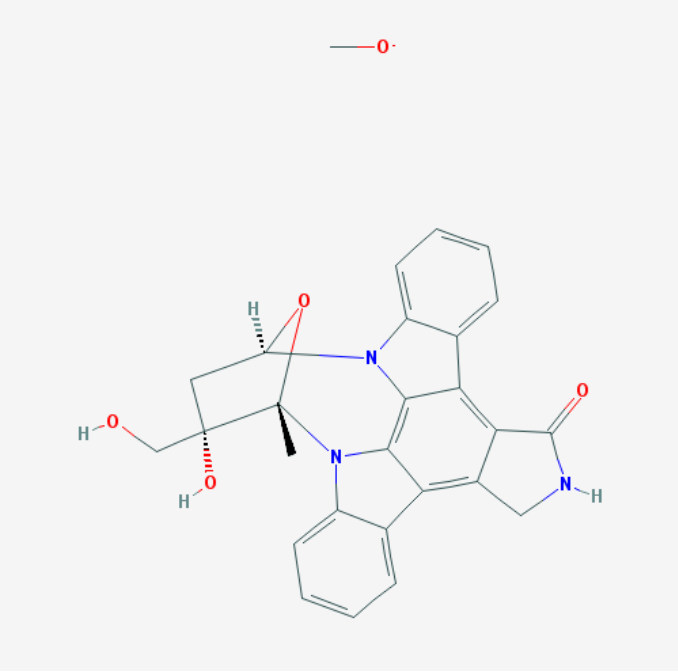
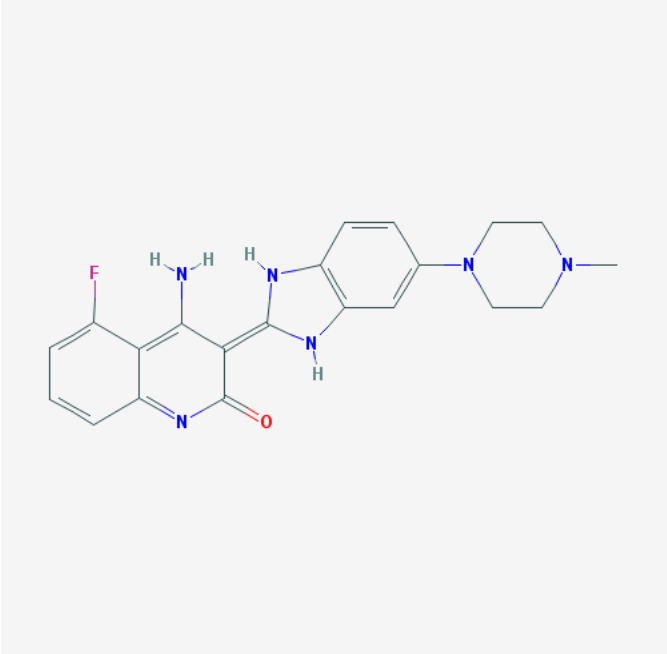
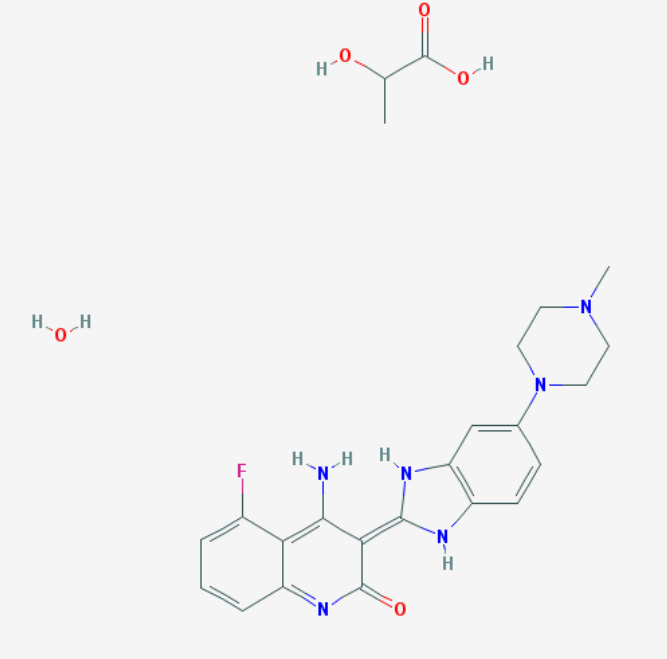
Nombre del compuesto	Estructura química
Quizartinib (CID 24889392)	 The chemical structure of Quizartinib is shown. It features a morpholine ring connected via an ethoxy linker to a benzothiazole system. This is further connected to a phenyl ring, which is linked to an amide group. The amide is connected to a pyrazole ring, which has a tert-butyl group at the 3-position.
Dihidrocloruro de quizartinib (CID 25184035)	 The chemical structure of the dihydrochloride salt of Quizartinib is shown. It includes the same Quizartinib molecule as above, but with two hydrochloride (HCl) molecules indicated below it, representing the salt form.
Midostaurina (CID 9829523)	 The chemical structure of Midostaurina is shown. It is a complex polycyclic molecule with multiple fused rings, including a central benzene ring and several nitrogen-containing heterocycles. It features a carboxamide group and a methoxy group.

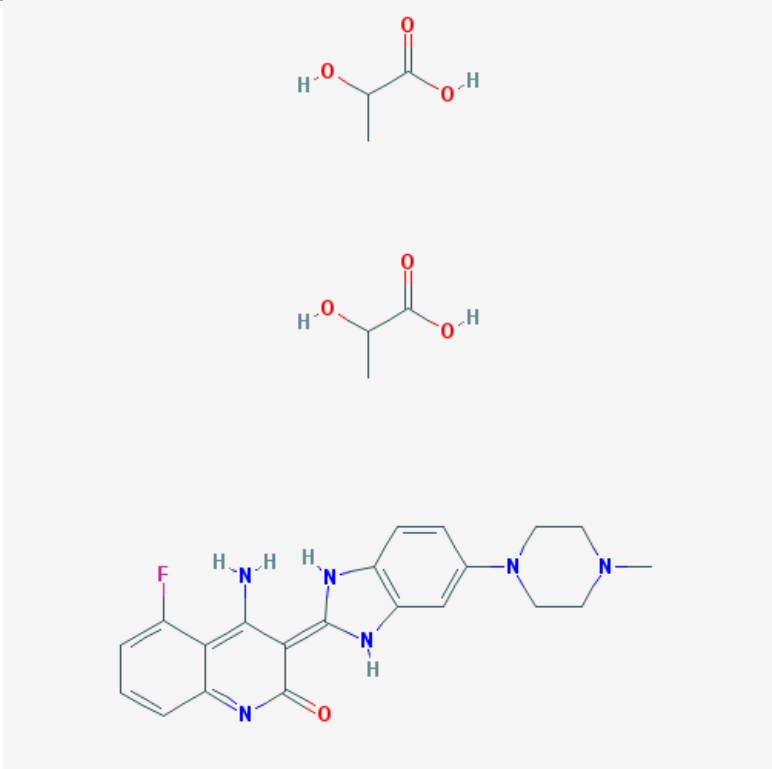
Nombre del compuesto	Estructura química
Hidrato de midostaurina (CID 71311854)	
Sorafenib (CID 216239)	
Tosilato de sorafenib (CID 406563)	

Nombre del compuesto	Estructura química
Sulfato de sorafenib (CID 86672519)	
Hidrobromuro de sorafenib (CID 44599974)	

Nombre del compuesto	Estructura química
Hidrocloruro de sorafenib (CID 44599975)	
Sunitinib (CID 5329102)	

Nombre del compuesto	Estructura química
Malato de sunitinib (CID 6456015)	
Lestarutinib (CID 126565)	
Hidrato de lestarutinib (CID 45111934)	

Nombre del compuesto	Estructura química
Metanolato de lestarutinib (CID 131738508)	
Dovitinib (CID 9886808)	
Lactato de dovitinib (CID 44150621)	

Nombre del compuesto	Estructura química
Ácido Diláctico de Dovitinib (CID 66553150)	 The image displays two chemical structures. The top structure is Lactic acid, shown in its neutral form with a central carbon atom bonded to a hydroxyl group (H-O), a methyl group, and a carboxylic acid group (C=O and O-H). The bottom structure is Dovitinib, a complex molecule featuring a quinoline core. It has a fluorine atom at the 6-position, a hydrazine group at the 2-position, and a 4-(4-methylpiperidin-1-yl)phenyl group at the 3-position. The quinoline ring also contains a carbonyl group and an imidazole-like ring system.

La expresión "receptor de antígenos quimérico" (CAR), como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína fusionada que comprende un dominio extracelular capaz de unirse

5 a un antígeno, un dominio transmembrana procedente de un polipéptido diferente de un polipéptido del que se obtiene el dominio extracelular y al menos un dominio intracelular. El "receptor de antígenos quimérico (CAR)" a veces se denomina "receptor quimérico", un "cuerpo T" o un "receptor inmunitario

10 quimérico (CIR, por sus siglas en inglés)". El "dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno" significa cualquier oligopéptido o polipéptido que pueda unirse a un determinado antígeno. El "dominio intracelular" o "dominio de señalización intracelular" significa cualquier oligopéptido o polipéptido

15 conocido por funcionar como un dominio que transmite una señal para provocar la activación o inhibición de un proceso biológico en una célula. En determinadas realizaciones, el dominio intracelular puede comprender, de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso comprender además, uno o

más dominios de señalización coestimuladores además del dominio de señalización primario. El "dominio transmembrana" significa cualquier oligopéptido o polipéptido que se sepa que atraviesa la membrana celular y que puede funcionar para unir los dominios extracelular y de señalización. Un receptor de antígenos quimérico puede comprender opcionalmente un "dominio de bisagra" que sirve como un enlazador entre los dominios extracelular y transmembrana. En el presente documento se divulgan secuencias polinucleotídicas no limitantes ilustrativas que codifican componentes de cada dominio, p. ej.:

Dominio de bisagra: Secuencia de bisagra de cadena pesada de IgG1:

CTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCG y,

opcionalmente, un equivalente de la misma.

Dominio de bisagra: Secuencia de aminoácidos de bisagra de cadena pesada de IgG1:

LEPKSCDKTHTCPPCP y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Dominio transmembrana: Región transmembrana de CD28:

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGG

CCTTTATTATTTCTGGGTG y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Dominio transmembrana: Secuencia de aminoácidos de la región transmembrana de CD28:

FWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Dominio intracelular: Región de señalización

coestimuladora de 4-1BB:

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAA
CTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGA
ACTG y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

5

Dominio intracelular: Secuencia de aminoácidos de la
región de señalización coestimuladora de 4-1BB:

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL y, opcionalmente,
un equivalente de la misma.

10

Dominio intracelular: Región de señalización
coestimuladora de CD28:

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCG
GGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTC

15 C y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Dominio intracelular: Secuencia de aminoácidos de la
región de señalización coestimuladora de CD28:

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS y, opcionalmente, un

20 equivalente de la misma.

Dominio intracelular: Región de señalización CD3 zeta:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCT
ATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG

25 GGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAA

CTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGA
GGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGA

CGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA y, opcionalmente, un
equivalente de la misma.

30

Dominio intracelular: Secuencia de aminoácidos de la

región de señalización CD3 zeta:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR y,

opcionalmente, un equivalente de la misma.

5

Realizaciones adicionales de cada componente de dominio
ilustrativo incluyen otras proteínas que tienen una función
biológica análoga que comparten al menos un 70 %, o de forma
alternativa al menos un 80 % de identidad de secuencia de
10 aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia,
más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia
con las proteínas codificadas por las secuencias de los ácidos
nucleicos divulgadas anteriormente. Adicionalmente, en el
presente documento se proporcionan ejemplos no limitantes de
15 dichos dominios.

Como se usa en el presente documento, la expresión
"secuencia enlazadora" se refiere a cualquier secuencia de
aminoácidos que comprende de 1 a 10, o de forma alternativa, 8
20 aminoácidos, o de forma alternativa 6 aminoácidos, o de forma
alternativa 5 aminoácidos que se pueden repetir de 1 a 10, o
de forma alternativa hasta aproximadamente 8, o de forma
alternativa hasta aproximadamente 6, o de forma alternativa
aproximadamente 5, o 4 o de forma alternativa 3, o de forma
25 alternativa 2 veces. Por ejemplo, el enlazador puede comprender
hasta 15 restos de aminoácidos que consisten en un pentapéptido
repetido tres veces. En un aspecto, la secuencia enlazadora es
un enlazador polipeptídico flexible (Glycine⁴Serine)³ que
comprende tres copias de gly-gly-gly-gly-ser, representado en
30 notación de secuencia de una sola letra como GGGGS.

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio de bisagra de CD8 α " se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 70 %, o de forma alternativa al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia del dominio de bisagra de CD8 α como se muestra en el presente documento. Las secuencias de ejemplo del dominio de bisagra de CD8 α para seres humanos, ratón y otras especies se proporcionan en Pinto, R.D. *et al.* (2006) *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110:169-177.

Las secuencias asociadas con el dominio de bisagra de CD8 α se proporcionan en Pinto, R.D. *et al.* (2006) *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110:169-177. Ejemplos no limitantes de estas incluyen:

Dominio de bisagra de CD8 alfa humano:
PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY y,
opcionalmente, un equivalente de la misma.

Dominio de bisagra de CD8 alfa de ratón:
KVNSTTTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY y,
opcionalmente, un equivalente de la misma.

Dominio de bisagra de CD8 alfa de gato:
PVKPTTTPAPRPPTQAPITTSQRVSLRPGTCQPSAGSTVEASGLDLSCDIY y,
opcionalmente, un equivalente de la misma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio transmembrana de CD8 α " se refiere a un fragmento de

proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 70 %, o de forma alternativa al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia del dominio transmembrana de CD8 α como se muestra en el presente documento. Las secuencias de fragmentos asociadas con las posiciones de aminoácidos 183 a 203 de la cadena alfa de la glucoproteína CD8 de la superficie de los linfocitos T humanos (número de acceso de GenBank: NP_001759.3), o las posiciones de aminoácidos 197 a 217 de la cadena alfa de la glucoproteína CD8 de la superficie de los linfocitos T de ratón (número de acceso de GenBank: NP_001074579.1) y las posiciones de aminoácidos 190 a 210 de la cadena alfa de la glicoproteína CD8 de la superficie de los linfocitos T de rata (número de acceso de GenBank: NP_113726.1) proporcionan secuencias de ejemplo adicionales del dominio transmembrana de CD8 α . Las secuencias asociadas con cada uno de los números de acceso enumerados se proporcionan de la siguiente manera:

Dominio transmembrana de CD8 alfa humano:
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Dominio transmembrana de CD8 alfa de ratón:
IWAPLAGICVALLLSLIITLI y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Dominio transmembrana de CD8 alfa de rata:
IWAPLAGICAVLLLSLVITLI y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región de señalización coestimuladora de 4-1BB" se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 70 %, o de forma alternativa al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la región de señalización coestimuladora de 4-1BB como se muestra en el presente documento. Secuencias de ejemplo no limitantes de la región de señalización coestimuladora de 4-1BB se proporcionan en la publicación de Estados Unidos 20130266551A1, tal como la secuencia ilustrativa proporcionada a continuación

Región de señalización coestimuladora de 4-1BB: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región de señalización coestimuladora de ICOS" se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos un 70 %, o de forma alternativa al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente un 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la región de señalización coestimuladora de ICOS como se muestra en el presente documento. Las secuencias de ejemplo no limitantes de la región de señalización coestimuladora de ICOS se proporcionan en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2015/0017141A1, la

secuencia polinucleotídica ilustrativa proporcionada a continuación.

Región de señalización coestimuladora de ICOS:

5 acaaaaaaga agtattcatc cagtgtgcac gaccctaacg gtgaatacat
gttcatgaga gcagtgaaca cagccaaaaa atccagactc acagatgtga cccta
y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Secuencia de aminoácidos de la región de señalización

10 coestimuladora de ICOS:

TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL y, opcionalmente, un
equivalente de la misma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región

15 de señalización coestimuladora de OX40" se refiere a un
fragmento de proteína específico asociado con este nombre y
cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga
que comparta al menos un 70 %, o de forma alternativa al menos
un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, o de forma
20 alternativa un 90 % de identidad de secuencia, o de forma
alternativa al menos un 95 % de identidad de secuencia con la
secuencia de la región de señalización coestimuladora de OX40
como se muestra en el presente documento. Las secuencias de
ejemplo no limitantes de la región de señalización
25 coestimuladora de OX40 se divulga en la publicación de
solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2012/20148552A1 e
incluyen la secuencia ilustrativa proporcionada a
continuación.

30 Región de señalización coestimuladora de OX40:

AGGGACCAG AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAGCCCCCT GGGGGAGGCA

GTTTCCGGAC CCCCATCCAA GAGGAGCAGG CCGACGCCCA CTCCACCCTG
GCCAAGATC y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Secuencia de aminoácidos de la región de señalización
5 coestimuladora de OX40:
RDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI y, opcionalmente, un
equivalente de la misma.

Como se usa en el presente documento, la expresión
10 "dominio transmembrana de CD28" se refiere a un fragmento de
proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra
molécula que tenga una función biológica análoga que comparta
al menos un 70 %, o de forma alternativa al menos un 80 % de
identidad de secuencia de aminoácidos, al menos un 90 % de
15 identidad de secuencia, o de forma alternativa al menos 95 %
de identidad de secuencia con la secuencia del dominio
transmembrana CD28 como se muestra en el presente documento.
Las secuencias de fragmentos asociadas con los números de
acceso de GenBank: XM_006712862.2 y XM_009444056.1
20 proporcionan secuencias de ejemplo adicionales, no limitantes,
del dominio transmembrana CD28.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región
de señalización coestimuladora de CD28" se refiere a un
25 fragmento de proteína específico asociado con este nombre y
cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga
que comparta al menos un 70 %, o de forma alternativa al menos
un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, o de forma
alternativa un 90 % de identidad de secuencia, o de forma
30 alternativa al menos un 95 % de identidad de secuencia con la
secuencia de la región de señalización coestimuladora de CD28

mostrada en el presente documento. Las secuencias de ejemplo del dominio de señalización coestimulador de CD28 se proporcionan en la Patente de Estados Unidos N.º 5.686.281; Geiger, T.L. *et al.* (2001) *Blood* 98: 2364-2371; Hombach, A. *et al.* (2001) *J Immunol* 167: 6123-6131; Maher, J. *et al.* (2002) *Nat. Biotechnol.* 20: 70-75; Haynes, N.M. *et al.* (2002) *J Immunol* 169: 5780-5786 (2002); Haynes, N.M. *et al.* (2002) *Blood* 100: 3155-3163. Ejemplos no limitantes incluyen los restos 114-220 de las siguientes. Secuencia de CD28: MLRLLLALNL FPSIQVTGNK

10 ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLDSAVEVCVVYG
 NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY
 FCKIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWLVVVVG
 GVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSD YNMTPRRPG PTRKHYPYA
 PPRDFAAYRS equivalentes de la misma.

15

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio de señalización de CD3 zeta" se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que

20 comparta al menos un 70 %, o de forma alternativa al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, o de forma alternativa un 90 % de identidad de secuencia, o de forma alternativa al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia del dominio de señalización CD3 zeta mostrada en el

25 presente documento. Las secuencias de ejemplo no limitantes del dominio de señalización CD3 zeta se proporcionan en la Patente de Estados Unidos N.º 8.399.645., p.ej.:
 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
 LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR.

30

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen

suicida" es un gen capaz de inducir la apoptosis celular; Ejemplos no limitantes incluyen HSV-TK (timidina cinasa del virus del herpes simple), citosina desaminasa, nitrorreductasa, carboxilesterasa, citocromo P450 o PNP (purina nucleósido fosforilasa), EGFR truncado o caspasa inducible ("iCasp"). Los genes suicidas pueden funcionar a lo largo de una variedad de vías y, en algunos casos, pueden ser inducible por un agente inductor tal como una molécula pequeña. Por ejemplo, el gen suicida iCasp comprende una porción de una proteína caspasa unida operativamente a una proteína optimizada para unirse a un agente inductor; la introducción del agente inductor en una célula que comprende el gen suicida da como resultado la activación de la caspasa y la posterior apoptosis de dicha célula.

El término "FKBP", o proteína de unión a FK506, se refiere a una familia de proteínas que tienen actividad prolil isomerasa y están relacionadas con la función de las ciclofilinas. Las FKBP se han identificado en muchos eucariotas, desde levaduras hasta seres humanos y funcionan como chaperonas de plegamiento de proteínas para proteínas que contienen restos de prolina. Junto con la ciclofilina, las FKBP pertenecen a la familia de las inmunofilinas. Una FKBP ilustrativa no limitante es la FKBP12 humana (también denominada FKBP1A), número de referencia de UniProt P62942. Otros ejemplos no limitantes de FKBP incluyen los proporcionados por los números de acceso de GenBank AH002818, BC119732.1, NM_001199786.1 y NM_054014.3.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "T2A" y "péptido 2A" se usan indistintamente para referirse a

cualquier péptido 2A o fragmento del mismo, cualquier péptido similar a 2A o fragmento del mismo, o un péptido artificial que comprenda los aminoácidos requeridos en una secuencia peptídica relativamente corta (del orden de 20 aminoácidos de largo dependiendo del virus de origen) que contenga el motivo polipeptídico consenso D-V/I-E-X-N-P-G-P, en donde X se refiere a cualquier aminoácido que generalmente se cree que se autoescinde.

10 El término "transducir" o "transducción", tal como se aplica a la producción de células con receptores de antígenos quiméricos, se refiere al proceso mediante el cual se introduce una secuencia de nucleótidos extraña en una célula. En algunas realizaciones, esta transducción se realiza mediante un vector.

15

Una "composición" normalmente se refiere a una combinación del agente activo, p.ej., compuesto o composición y un transportador de origen natural o de origen no natural, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizante, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservante, adyuvante o similares, e incluye transportadores farmacéuticamente aceptables. Los transportadores también incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos como excipientes y aditivos farmacéuticos (p. ej., azúcares, que incluyen monosacáridos, di-, tri-, tetraoligosacáridos y oligosacáridos; azúcares derivatizados tal como los alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcares), que pueden estar presentes solos o en combinación, comprendiendo solos o en combinación 1-99,99 % en peso o volumen. Los excipientes de

20

25

30

proteínas ilustrativos incluyen albúmina de suero tal como albúmina de suero humano (HSA, por sus siglas en inglés), albúmina humana recombinante (rHA, por sus siglas en inglés), gelatina, caseína y similares. Los componentes representativos de aminoácidos/anticuerpos, que también pueden funcionar con una capacidad de tampón, incluyen alanina, arginina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares. Los excipientes de carbohidratos también están previstos dentro del alcance de esta tecnología, cuyos ejemplos incluyen, pero sin limitación, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

Como se usa en el presente documento, un "cáncer" es una patología caracterizada por la presencia en un sujeto de células que demuestran una replicación anormal incontrolada y puede usarse indistintamente con el término "tumor". En algunas realizaciones, el cáncer es una leucemia o un linfoma. En determinadas realizaciones, el cáncer es leucemia mieloide aguda o leucemia linfoblástica aguda. Como se usa en el presente documento, una "leucemia" es un cáncer de la sangre o de la médula ósea caracterizado por un aumento anormal de glóbulos blancos inmaduros. La afección específica de la leucemia mieloide aguda (AML), también conocida como leucemia mielógena aguda o leucemia mieloblástica aguda, es un cáncer

de las células sanguíneas de origen mieloide, caracterizado por el rápido crecimiento de células mieloides anómalas que se acumulan en la médula ósea e interfieren con la producción de células sanguíneas normales. La afección específica de la leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), también conocida como leucemia linfocítica aguda o leucemia linfoide aguda, es un cáncer de los glóbulos blancos, caracterizado por la sobreproducción y acumulación de leucocitos inmaduros malignos, (linfoblastos) que dan como resultado una carencia de células sanguíneas sanas normales. Como se usa en el presente documento, un "linfoma" es un cáncer de la sangre caracterizado por el desarrollo de tumores de células sanguíneas y síntomas de ganglios linfáticos agrandados, fiebre, sudores empapantes, pérdida de peso involuntaria, picazón y sensación cansancio constantemente.

Un "tumor sólido" es una masa de tejido anómala que habitualmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos, metastásicos o no metastásicos. Los diferentes tipos de tumores sólidos se nombran por el tipo de células que los forman. Ejemplos de tumores sólidos incluyen sarcomas, carcinomas y linfomas.

Una "célula normal correspondiente al tipo de tejido canceroso" se refiere a una célula normal del mismo tipo de tejido que el tejido canceroso. Un ejemplo no limitante es un leucocito normal de un paciente, p.ej., un paciente con leucemia.

Como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad en un sujeto se refiere a (1)

evitar que los síntomas o la enfermedad se produzcan en un sujeto que está predispuesto o que todavía no presenta síntomas de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad o detener su desarrollo; o (3) mejorar o provocar la regresión de la enfermedad o los síntomas de la enfermedad. Como se entiende en la técnica, "tratamiento" es un enfoque para obtener beneficio o resultados deseados, incluidos resultados clínicos. Para los fines de la presente tecnología, los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir uno o más, pero sin limitación, alivio o mejora de uno o más síntomas, disminución de la extensión de una afección (incluida una enfermedad), estado estabilizado (*es decir.*, no empeora) de una afección (incluida la enfermedad), retraso o ralentización de la afección (incluida la enfermedad), progresión, mejora o paliación de la afección (incluida la enfermedad), estados y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. Los tratamientos que contienen las composiciones y métodos divulgados pueden ser terapia de primera línea, segunda línea, tercera línea, cuarta línea, quinta línea y están destinados a ser utilizados como terapia única o en combinación con otras terapias apropiadas. En un aspecto, "tratamiento" excluye la prevención. Cuando la enfermedad es cáncer, los siguientes criterios de valoración clínicos son ejemplos no limitantes de tratamiento: reducción de la carga tumoral, ralentización del crecimiento tumoral, mayor supervivencia general, más tiempo hasta la progresión del tumor, inhibición de la metástasis o reducción de la metástasis del tumor.

La expresión "primera línea" o "segunda línea" o "tercera línea" se refiere al orden de tratamiento recibido por un paciente. Los regímenes de terapia de primera línea son

tratamientos que se administran primero, mientras que la terapia de segunda o tercera línea se administran después de la terapia de primera línea o después de la terapia de segunda línea, respectivamente. El National Cancer Institute define la

5 terapia de primera línea como "el primer tratamiento para una enfermedad o afección". En pacientes con cáncer, el tratamiento primario puede ser cirugía, quimioterapia, radioterapia o una combinación de estas terapias. Los expertos en la materia también denominan a la terapia de primera línea "terapia

10 primaria y tratamiento primario". Véase el sitio web del National Cancer Institute en www.cancer.gov, última visita el 1 de mayo de 2008. Normalmente, un paciente recibe un régimen de quimioterapia posterior porque el paciente no mostró una respuesta clínica o subclínica positiva a la terapia de primera

15 línea o porque la terapia de primera línea se detuvo.

Una "cantidad efectiva" o "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un agente o a las cantidades combinadas de dos o más agentes, que, cuando se administran para el tratamiento

20 de un mamífero u otro sujeto, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad. La "cantidad eficaz" variará dependiendo del agente o de los agentes, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, etc., del sujeto que se va a tratar.

25 "Terapia citorreductora" como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, quimioterapia, crioterapia y radioterapia. Se conocen y se usan ampliamente en la técnica agentes que actúan reduciendo la proliferación celular. Los fármacos de quimioterapia que destruyen las

30 células cancerosas solamente cuando se están dividiendo se denominan específicos del ciclo celular. Estos fármacos

incluyen agentes que actúan en fase S, incluidos los inhibidores de las topoisomerasas y los antimetabolitos.

Los inhibidores de las topoisomerasas son fármacos que interfieren con la acción de las enzimas topoisomerasas (topoisomerasa I y II). Durante el proceso de los tratamientos de quimioterapia, las enzimas topoisomerasas controlan la manipulación de la estructura del ADN necesaria para la replicación y, por tanto, son específicas del ciclo celular. Ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa I incluyen los análogos de camptotecán enumerados anteriormente, irinotecán y topotecán. Ejemplos de inhibidores de topoisomerasa II incluyen amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido.

Los antimetabolitos son habitualmente análogos de sustratos metabólicos normales, interfiriendo con frecuencia con los procesos implicados en la replicación cromosómica. Atacan a las células en fases muy específicas del ciclo. Los antimetabolitos incluyen antagonistas del ácido fólico, p.ej., metotrexato; antagonista de pirimidinas, p.ej., 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, capecitabina y gemcitabina; antagonistas de purinas, p.ej., 6-mercaptopurina y 6-tioguanina; inhibidor de la adenosina desaminasa, p.ej., cladribina, fludarabina, nelarabina y pentostatina; y similares.

Los alcaloides vegetales proceden de determinados tipos de plantas. Los alcaloides de la vinca se producen a partir de la planta del bígaro (*Catharanthus rosea*). Los taxanos se producen a partir de la corteza del árbol del tejo del Pacífico (taxus). Los alcaloides y taxanos de la vinca también se

conocen como agentes antimicrotúbulos. Las podofilotoxinas proceden de la planta de la manzana de mayo. Los análogos de camptotecán proceden del "árbol feliz" asiático (*Camptotheca acuminata*). Las podofilotoxinas y los análogos de camptotecán también se clasifican como inhibidores de las topoisomerasas. Los alcaloides vegetales son generalmente específicos del ciclo celular.

Ejemplos de estos agentes incluyen alcaloides de la vinca, p.ej., vincristina, vinblastina y vinorelbina; taxanos, p.ej., paclitaxel y docetaxel; podofilotoxinas, p.ej., etopósido y tenisopido; y análogos de camptotecán, p.ej., irinotecán y topotecán.

La crioterapia incluye, pero sin limitación, terapias que implican la disminución de la temperatura, por ejemplo, terapia hipotérmica.

La radioterapia incluye, pero sin limitación, la exposición a la radiación, p.ej., radiación ionizante, radiación UV, como se conoce en la técnica. Las dosis ilustrativas incluyen, pero sin limitación, una dosis de radiación ionizante en un intervalo de al menos aproximadamente 2 Gy a no más de aproximadamente 10 Gy y/o una dosis de radiación ultravioleta en un intervalo de al menos aproximadamente 5 J/m² hasta no más de aproximadamente 50 J/m², habitualmente de aproximadamente 10 J/m².

Como se usa en el presente documento, el término "hematopoyesis" se refiere a la capacidad de un sujeto para producir células sanguíneas y/o plaquetas en la médula ósea.

La expresión "hematopoyesis normal" puede referirse ya sea al nivel inicial de hematopoyesis de un sujeto y/o un umbral clínicamente aceptable para la hematopoyesis normal basándose en los niveles promedio de células sanguíneas y/o plaquetas producidas por una población de sujetos que no padecen una enfermedad o trastorno que afecta a la hematopoyesis, tales como, pero sin limitación, un cáncer de la sangre o la médula ósea. Por tanto, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "mantener la hematopoyesis normal" se refiere a la capacidad del sujeto para mantener el nivel normal especificado durante o después de una intervención y la expresión "recuperar la hematopoyesis normal" se refiere a la capacidad del sujeto para volver al nivel normal especificado durante o después de una intervención.

Como se usa en el presente documento, el término "CD34" se refiere a una proteína expresada en una variedad de células que incluyen, pero sin limitación, células hematopoyéticas y una subpoblación de células dendríticas asociadas con el ID de Gene Cards GC01M207880. Se puede encontrar una secuencia de proteína ilustrativa no limitante de CD34 humana en el número de referencia de UniProt P28906; CD34 de ratón, número de referencia de UniProt Q64314. Las células "CD34+" son aquellas células que se detecta que tienen expresión superficial de CD34. Células CD34 ilustrativas no limitantes incluyen células madre hematopoyéticas que son capaces de autorrenovación, proliferación y diferenciación en progenitoras en las líneas mieloide, linfoide y eritroide encontradas en el compartimento Lin-CD34 CD38-CD90 CD45RA-; estas células son críticas para el injerto de células hematopoyéticas y también se sabe que son FLT3+. Véanse Bhatia *et al.* (1997) PNAS 94(10):5230-5235; Notta

et al. (2010) *Blood* 115(18):3074-3077; Kikushige *et al.* (2008) *J. Immunol.* 180(11):7358-7367.

Como se usa en el presente documento, el término
5 "purificado/a" no requiere pureza absoluta; más bien, se
concibe como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, un
ácido nucleico, péptido, proteína, complejos biológicos u otro
compuesto activo purificado es uno que se aísla total o
parcialmente de proteínas u otros contaminantes. Generalmente,
10 los péptidos, proteínas, complejos biológicos u otros
compuestos activos sustancialmente purificados para su uso
dentro de la divulgación comprenden más del 80 % de todas las
especies macromoleculares presentes en una preparación antes
de la mezcla o formulación del péptido, proteína, complejo
15 biológico u otro compuesto activo con un transportador,
excipiente, tampón, agente potenciador de la absorción,
estabilizante, conservante, adyuvante u otro coingrediente
farmacéuticos en una formulación farmacéutica completa para
administración terapéutica. Más habitualmente, el péptido,
20 proteína, el complejo biológico u otro compuesto activo se
purifica para representar más del 90 %, con frecuencia más del
95 % de todas las especies macromoleculares presentes en una
preparación purificada antes de mezclarla con otros
ingredientes de la formulación. En otros casos, la preparación
25 purificada puede ser esencialmente homogénea, en donde otras
especies macromoleculares no son detectables mediante técnicas
convencionales.

Como se usa en el presente documento, la expresión
30 "marcador detectable" se refiere a al menos un marcador capaz
de producir, directa o indirectamente, una señal detectable.

Una lista no exhaustiva de este marcador incluye enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo, por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, cromóforos tales como colorantes fluorescentes, luminiscentes, grupos con densidad electrónica detectada por microscopía electrónica o por sus propiedades eléctricas, tales como conductividad, amperometría, voltametría, impedancia, grupos detectables, por ejemplo, cuyas moléculas son de tamaño suficiente para inducir modificaciones detectables en sus propiedades físicas y/o químicas, tal detección puede lograrse mediante métodos ópticos tales como difracción, resonancia de plasmón superficial, variación de la superficie, el cambio de ángulo de contacto o métodos físicos tales como espectroscopia de fuerza atómica, efecto túnel, o moléculas radiactivas tales como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I . En un aspecto, un marcador detectable excluye polinucleótidos naturalmente fluorescentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "marcador de purificación" se refiere a al menos un marcador útil para la purificación o identificación. Una lista no exhaustiva de este marcador incluye His, lacZ, GST, proteína de unión a maltosa, NusA, BCCP, c-myc, CaM, FLAG, GFP, YFP, cherry, tiorredoxina, poli(NANP), V5, Snap, HA, proteína de unión a quitina, Softag 1, Softag 3, Strep, o proteína S. Los marcadores de fluorescencia directa o indirecta adecuados comprenden FLAG, GFP, YFP, RFP, dTomato, cherry, Cy3, Cy 5, Cy 5,5, Cy 7, DNP, AMCA, Biotina, Digoxigenina, Tamra, rojo Texas, rodamina, Alexa flúor, FITC, TRITC o cualquier otro colorante o hapteno fluorescente.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para la transferencia entre diferentes hospedadores, incluyendo, pero sin limitación, un plásmido, un virus, un cósmido, un bacteriófago, un BAC, un YAC, etc. En algunas realizaciones, los vectores plasmídicos se pueden preparar a partir de vectores disponibles comercialmente. En otras realizaciones, los vectores víricos pueden producirse a partir de baculovirus, retrovirus, adenovirus, VAA, etc. de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el vector vírico es un vector lentivírico. Como se usa en el presente documento, el término "policistrónico" en referencia a un vector se refiere a un vector que comprende múltiples regiones codificantes (exones), p.ej., monocistrónico (que tiene una región codificante), bicistrónico (que tiene dos regiones codificantes) y tricistrónico (que tiene tres regiones codificantes).

Las secuencias asociadas con cada uno de los números de acceso de GenBank, números de referencia de UniProt, otros números de identificación de referencia y referencias enumerados anteriormente se incorporan en el presente documento como referencia.

25 **Lista de abreviaturas**

AML: leucemia mieloide aguda

ALL: leucemia linfoblástica aguda

CAR: receptor de antígenos quimérico

iCasp: caspasa inducida

30

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA DIVULGACIÓN

Debido a los resultados sin precedentes que se han obtenido recientemente en linfomas y leucemias de linfocitos B utilizando un tratamiento autólogo con linfocitos T con receptores de antígenos quiméricos (CAR) genéticamente modificados (Maude, S.L. *et al.* (2014) *New Engl. J. Med.* 371:1507-1517; Porter, D.L. *et al.* (2011) *New Engl. J. Med.* 365:725-733), varios laboratorios han comenzado a aplicar este enfoque a los tumores sólidos, incluyendo el cáncer de ovario, cáncer de próstata y tumores de páncreas. Los linfocitos T modificados con CAR combinan la especificidad de direccionamiento independiente de HLA de un anticuerpo monoclonal con la actividad citolítica, propiedades de proliferación y localización de los linfocitos T activados, pero no responden a la supresión de puntos de control. Debido a su capacidad para destruir dianas que expresan antígenos directamente, los linfocitos T con CAR son altamente tóxicos para cualquier tejido o célula con antígeno positivo, por lo que es un requisito construir CAR con anticuerpos tumorales altamente específicos. Hasta la fecha, se han construido linfocitos T modificados con CAR para tumores sólidos humanos contra el receptor de α -folato, mesotelina, MUC-CD, PSMA y otras dianas; pero la mayoría tiene alguna expresión de antígeno inespecífica en tejidos normales. Estas construcciones no han mostrado los mismos resultados excepcionales en pacientes que enfatizan la necesidad de estudios adicionales para identificar nuevas dianas y métodos de construcción de linfocitos T con CAR que puedan usarse contra tumores sólidos y otros cánceres. La presente divulgación cumple con estos desafíos. El solicitante había descubierto que las células NK con CAR o las células NK en cultivo prolongado expresaban cantidades sustanciales de la

proteína PD-1 de punto de control, que es una señal inhibidora en las células NK de pacientes con cáncer, mientras que los blastocitos de AML expresaron PD-L1 en la superficie celular. De estas plataformas biespecíficas anteriores y otros grupos, la principal preocupación del anticuerpo biespecífico ("biAb") es la corta semivida, que limita la biodisponibilidad y eficacia. Por lo tanto, el solicitante buscó superar esta limitación técnica y proporcionar una actividad citolítica sinérgica contra la AML a través de una mayor interacción, mayor activación e inhibición de los puntos de control antagonistas.

Por tanto, la presente divulgación proporciona uno o más polinucleótidos aislados y/o vectores que codifican un receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende: 1) un dominio de unión específico de FLT3, que en algunos aspectos, es el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3 y 2) un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1. Los métodos y composiciones relacionados con el uso y producción de los mismos se proporcionan adicionalmente en el presente documento.

Receptores de antígenos quiméricos y usos de los mismos

Componentes del CAR

La presente divulgación proporciona receptores de antígenos quiméricos (CAR) que se unen a FLT3, comprendiendo el CAR o consistiendo esencialmente en, o consistiendo en, un resto de activación celular que comprende un dominio extracelular, transmembrana e intracelular. El dominio extracelular comprende un elemento de unión específico de diana, denominado de otro modo dominio de unión a antígeno. En

un aspecto, el dominio intracelular o dominio citoplásmico comprende una región de señalización coestimuladora y una porción de cadena zeta. El CAR puede comprender además opcionalmente un dominio espaciador de hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos, más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos.

Dominio espaciador. El CAR puede comprender además opcionalmente un dominio espaciador de hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos, más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos. Por ejemplo, el espaciador puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos. Un dominio espaciador puede comprender, por ejemplo, una porción de un dominio Fc humano, un dominio CH3, o la región de bisagra de cualquier inmunoglobulina, tales como IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, o variantes de las mismas. Por ejemplo, algunas realizaciones pueden comprender una bisagra de IgG4 con o sin una mutación S228P, L235E y/o N297Q (de acuerdo con la numeración de Kabat). Los espaciadores adicionales incluyen, pero sin limitación, regiones de bisagra de CD4, CD8 y CD28.

Dominio de unión a antígeno. Los CAR de la presente divulgación comprenden un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3 o un anticuerpo (es decir, el anticuerpo completo) que se une a FLT3. Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a FLT3 están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Becton Dickinson Biosciences y otras fuentes comerciales, p.ej., los que figuran en la dirección web:

biocompare.com/Search-Antibodies/?search=FLT3&said=0. Los métodos para preparar fragmentos de unión a antígeno se conocen en la técnica y se describen brevemente en el presente documento. Los dominios de unión a antígeno pueden ser de cualquier especie apropiada, p.ej., oveja o ser humano.

En un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de un anticuerpo de FLT3. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende, o consiste esencialmente en, o consiste en un fragmento del anticuerpo específico de diana (es decir, un anticuerpo contra FLT3, por ejemplo, un scFv. Una región scFv puede comprender las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de inmunoglobulinas, conectadas con un péptido enlazador corto. El péptido enlazador puede tener de 1 a 50 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador es rico en glicina, aunque también puede contener serina o treonina.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, el polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica:

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCATTGAAGCTGT
CCTGCAAGTCTTCCGGGTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGAGGCC
TGGACATGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGACAGTTATAAAGACTACAAT
CAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTGGACAGATCCTCCAACACAGCCTACATGC

ACCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGAGCGATTACGAC
 GACCCCTTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA, o un
 fragmento de unión a antígeno o un equivalente de la misma.

5 En otras realizaciones, la región variable de cadena
 pesada comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente
 en, o incluso consiste además en, la secuencia polipeptídica:
 QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYN
 QKFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDSAVYYCARAITTTPFDFWGQGTTLTVSS, o
 10 un fragmento de unión a antígeno o un equivalente de la misma.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena
 pesada comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente
 en, o incluso consiste además en, el polipéptido codificado
 15 por la secuencia polinucleotídica divulgada:
 CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCA
 CCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAATACTATGGTTTACTGTTTGGTTCGCCAGTCTCC
 AGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGGAAGCACAGACTATAATGCA
 GCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAATACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAA
 20 TGAACAGTCTGCAGGCTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAAAAGGAGGGATCTA
 CTATGCTAACCATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC
 TCA, o un fragmento de unión a antígeno o un equivalente de la
 misma.

25 En otras realizaciones, la región variable de cadena
 pesada comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente
 en, o incluso consiste además en, la secuencia polipeptídica:
 QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLGVISGGSTDYNA
 AFISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYYANHYYAMDYWGQGTSTVTS
 30 S, o un fragmento de unión a antígeno o un equivalente de la
 misma.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de CDRH1 que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en, una secuencia de aminoácidos que comienza con SYWMH, NYGLH, o un equivalente de cada una de las mismas, seguido de 50 aminoácidos adicionales, o de forma alternativa aproximadamente 40 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 30 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 20 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 10 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 5 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 4, o 3, o 2 o 1 aminoácidos en el extremo carboxilo.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de CDRH2 que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en, una secuencia de aminoácidos que comienza con EIDPSDSYKDYNQKFKD, VIWSGGSTDYNAAFIS o un equivalente de cada una de las mismas, seguido de 50 aminoácidos adicionales, o de forma alternativa aproximadamente 40 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 30 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 20 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 10 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 5 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 4, o 3, o 2 o 1 aminoácidos en el extremo carboxilo.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de CDRH3 que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso

consiste además en, una secuencia de aminoácidos que comienza con AITTTPDF, GGIYYANHYYAMDY o un equivalente de cada una de las mismas, seguido de 50 aminoácidos adicionales, o de forma alternativa aproximadamente 40 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 30 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 20 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 10 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 5 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 4, o 3, o 2 o 1 aminoácidos en el extremo carboxilo.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, el polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica:

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTC
TTTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACA
TGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGG
TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGACTGAAG
ATTTTGGAGTGTATTTCTGTCAACAGAGTAACACCTGGCCGTACACGTTCCGAGGGGGGAC
CAAGCTGGAAATAAAACGG,

o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un equivalente de cada uno de los mismos.

En otras realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, la secuencia polipeptídica:
DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSIENNHWYQKSHESPRLLIKYASQSIISGIPSR
FSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSNTWPYTFGGGTKLEIKR,

o un fragmento de unión a antígeno o un equivalente de los mismos.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, el polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica:

5 GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTA
 TGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAAGAACTATATGGCCTG
 GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACTAGGGAA
 TCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTTCACTCTTACCATCA
 GCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTATCCGCT
 10 CACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG, o un fragmento de unión
 a antígeno o un equivalente de cada uno de los mismos.

En otras realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, la secuencia polipeptídica:

15 DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYMAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRE
 SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELKR o un
 fragmento de unión a antígeno o un equivalente de los mismos.

20 En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de CDRL1 que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en, una secuencia de aminoácidos que comienza con RASQSI>NNLH, KSSQSLLNSGNQKNYM, o un equivalente de cada
 25 una de las mismas, seguido de 50 aminoácidos adicionales, o de forma alternativa aproximadamente 40 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 30 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 20 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 10 aminoácidos, o de forma
 30 alternativa aproximadamente 5 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 4, o 3, o 2 o 1 aminoácidos en el

extremo carboxilo.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de CDRL2 que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso
5 consiste además en, una secuencia de aminoácidos que comienza con YASQSIG, GASTRES, o un equivalente de cada una de las mismas, seguido de 50 aminoácidos adicionales, o de forma alternativa aproximadamente 40 aminoácidos, o de forma
10 alternativa aproximadamente 30 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 20 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 10 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 5 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 4, o 3, o 2 o 1 aminoácidos en el
15 extremo carboxilo.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de CDRL3 que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso
20 consiste además en, una secuencia de aminoácidos que comienza con QQSNTWPYT, QNDHSYPLT, o un equivalente de cada una de las mismas, seguido de 50 aminoácidos adicionales, o de forma alternativa aproximadamente 40 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 30 aminoácidos, o de forma
25 alternativa aproximadamente 20 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 10 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 5 aminoácidos, o de forma alternativa aproximadamente 4, o 3, o 2 o 1 aminoácidos en el extremo carboxilo.

30

En otro aspecto de la presente divulgación, el dominio de

unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3 incluye una o más de las siguientes características:

(a) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una o más CDR que son al menos un 5 80 % idénticas a una CDR de un dominio variable de cadena ligera de cualquiera de las secuencias de cadena ligera divulgadas;

(b) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una o más CDR que son al menos un 10 80 % idénticas a una CDR de un dominio variable de cadena pesada de cualquiera de las secuencias de cadena pesada divulgadas;

(c) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera es al menos un 80 % idéntica a un dominio 15 variable de cadena ligera de cualquiera de las secuencias de cadena ligera divulgadas;

(d) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC es al menos un 80 % idéntica a un dominio variable de cadena pesada de cualquiera de las secuencias de cadena ligera 20 divulgadas; y

(e) el anticuerpo se une a un epítipo que se solapa con un epítipo unido por cualquiera de las secuencias divulgadas.

Ejemplos adicionales de equivalentes incluyen péptido que 25 tiene al menos un 85 %, o de forma alternativa al menos un 90 %, o de forma alternativa al menos un 95 %, o de forma alternativa al menos un 97 % de identidad de aminoácidos con el péptido o un polipéptido que está codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de alta 30 rigurosidad con el complemento de un polinucleótido que codifica el dominio de unión a antígeno, en donde las

condiciones de alta rigurosidad comprenden temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55 % a aproximadamente 75 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0,1x SSC, o agua desionizada.

Los dominios de unión a antígeno ilustrativos pueden comprender uno o más de los péptidos indicados a continuación y en un aspecto pueden comprender las tres CDR de las HC y LC indicadas para un antígeno particular divulgado en la **tabla 1** o los polinucleótidos que codifican las regiones variables de HC y LC de FLT3, proporcionados a continuación en la **tabla 1**.

Tabla 1

ANTICUER POS ANTI- FLT3	CDR H1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
FLT3-1	SYW MH	EIDPSDSYKDYNQ KFKD	AITTTPDFD	RASQSI>NNLH	YASQS IS	QQSNTW PYT
FLT3-2	NYG LH	VIWSGGSTDYNAA FIS	GGIYYANHYY AMDY	KSSQSLLNSGNQ KNYM	GASTR ES	QNDHSY PLT

Secuencia polinucleotídica de la región variable de cadena pesada de FLT3-1:
CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCATTGAAGCTGT
CCTGCAAGTCTTCCGGGTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGAGGCC
TGGACATGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGACAGTTATAAAGACTACAAT
CAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTGGACAGATCCTCCAACACAGCCTACATGC
ACCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGAGCGATTACGAC
GACCCCTTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA, o un
equivalente de la misma.

Secuencia polinucleotídica de región variable de cadena ligera de FLT3-1:

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTC
 TTTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACA
 5 TGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGG
 TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGACTGAAG
 ATTTTGGAGTGTATTTCTGTCAACAGAGTAACACCTGGCCGTACACGTTCCGAGGGGGGAC
 CAAGCTGGAAATAAAACGG, o un equivalente de la misma.

10 Secuencia polinucleotídica de la región variable de cadena pesada de FLT3-2:

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCA
 CCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAATACTATGGTTTACACTGGGTTCCGCCAGTCTCC
 AGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGAAGCACAGACTATAATGCA
 15 GCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAA
 TGAACAGTCTGCAGGCTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAAAAGGAGGGATCTA
 CTATGCTAACCATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC
 TCA, o un equivalente de la misma.

20 Secuencia polinucleotídica de región variable de cadena ligera de FLT3-2:

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTA
 TGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAAGAACTATATGGCCTG
 GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACTAGGGAA
 25 TCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTTCACTCTTACCATCA
 GCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTATCCGCT
 CACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG, o un equivalente de la misma.

30 Se describen otros ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos del dominio CDR de FLT3 en las Tablas 1-4 de la

solicitud de patente de Estados Unidos N.º: US20180346601, Tabla V de la solicitud de patente de Estados Unidos N.º: US20180037657, Tabla 10 de la solicitud de patente de Estados Unidos N.º: US20170037149, Tabla V de la solicitud de patente de Estados Unidos N.º: US20160272716, Tablas 1-3 de la solicitud de patente de Estados Unidos N.º: US20110091470 y Tablas 1-3 de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º: US20090297529.

10 Se describen ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y de la región variable de cadena ligera de FLT3 en las Tablas 1 y 3 de la solicitud de patente de Estados Unidos N.º: US20180346601, Tabla X de la solicitud de patente de Estados Unidos N.º: US20180037657, Tabla 10 de la solicitud de patente de Estados Unidos N.º: US20170037149 y Tabla VII de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º: US20160272716.

20 En un aspecto, la presente divulgación proporciona el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo que es al menos un 80 %, o de forma alternativa un 85 %, o de forma alternativa un 90 %, o de forma alternativa un 95 %, o de forma alternativa al menos un 97 %, idéntico a un FLT3-1. Ejemplos adicionales de equivalentes incluyen un polipéptido que está codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad con el complemento de un polinucleótido que codifica la secuencia del ácido nucleico del dominio de unión a antígeno, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x SSC;

concentraciones de formamida de aproximadamente 55 % a aproximadamente 75 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0,1x SSC, o agua desionizada.

5 En algunos aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, la secuencia de dominio variable de HC comprende una secuencia de dominio variable de FLT3-1 y la secuencia de dominio variable de LC comprende una secuencia de dominio variable de FLT3-1.

10

En un aspecto, la presente divulgación proporciona el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo que comprende las CDR de FLT3-1. En un aspecto, la presente divulgación proporciona el dominio de unión a antígeno del anticuerpo que
15 es al menos un 85 %, o de forma alternativa un 80 %, o de forma alternativa un 85 %, o de forma alternativa un 90 %, o de forma alternativa un 95 %, o de forma alternativa al menos un 97 % idéntico a las CDR de FLT3-1, o un polipéptido que está codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones
20 de alta rigurosidad con el complemento de un polinucleótido que codifica la secuencia de los ácidos nucleicos de las CDR de FLT3, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones de tampón de
25 aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55 % a aproximadamente 75 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0,1x SSC, o agua desionizada.

30 En un aspecto, la presente divulgación proporciona el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo que es al menos

un 80 %, o de forma alternativa un 85 %, o de forma alternativa un 90 %, o de forma alternativa un 95 %, o de forma alternativa al menos un 97 %, idéntico a un FLT3-2. Ejemplos adicionales de equivalentes incluyen un polipéptido que está codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad con el complemento de un polinucleótido que codifica la secuencia del ácido nucleico del dominio de unión a antígeno, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55 % a aproximadamente 75 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0,1x SSC, o agua desionizada.

En algunos aspectos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, la secuencia de dominio variable de HC comprende una secuencia de dominio variable de FLT3-2 y la secuencia de dominio variable de LC comprende una secuencia de dominio variable de FLT3-2.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo que comprende las CDR de FLT3-2. En un aspecto, la presente divulgación proporciona el dominio de unión a antígeno del anticuerpo que es al menos un 85 %, o de forma alternativa un 80 %, o de forma alternativa un 85 %, o de forma alternativa un 90 %, o de forma alternativa un 95 %, o de forma alternativa al menos un 97 % idéntico a las CDR de FLT3-2, o un polipéptido que está codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad con el complemento de un polinucleótido

que codifica la secuencia de los ácidos nucleicos de las CDR de FLT3, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55 % a aproximadamente 75 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0,1x SSC, o agua desionizada.

10 *Dominio transmembrana.* El dominio transmembrana puede proceder de una fuente natural o de una sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede proceder de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana de uso particular en esta divulgación pueden
15 proceder de CD8, CD28, CD3, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154, TCR. De forma alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá predominantemente restos hidrófobos tales como leucina y valina. Preferentemente un
20 triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Opcionalmente, un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización
25 citoplásmico del CAR. Un doblete glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

Dominio citoplasmático. El dominio citoplásmico o dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la
30 activación de al menos una de las funciones efectoras tradicionales de una célula inmunitaria en la que se ha

colocado un CAR. El dominio de señalización intracelular se refiere a una porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula inmunitaria para que realice su función específica. Se puede usar un dominio de señalización completo o una porción truncada del mismo siempre que la porción truncada sea suficiente para transducir la señal de la función efectora. Las secuencias citoplásmicas del TCR y los correceptores, así como los derivados o variantes de los mismos, pueden funcionar como dominios de señalización intracelular para su uso en un CAR. Los dominios de señalización intracelular de uso particular en esta divulgación pueden proceder de FcR, TCR, CD3, CD28, CD22, CD79a, CD79b, CD66d. En algunas realizaciones, el dominio de señalización del CAR puede comprender un dominio de señalización CD3 ζ .

Debido a que las señales generadas a través del TCR son por sí solas insuficientes para la activación completa de un linfocito T, también puede ser necesaria una señal secundaria o coestimuladora. Por tanto, la región intracelular de una molécula de señalización coestimuladora, incluyendo, pero sin limitación, los dominios intracelulares de las proteínas CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 o un ligando que se une específicamente con CD83, también puede incluirse en el dominio citoplásmico del CAR. Por ejemplo, un CAR puede comprender uno, dos o más dominios coestimuladores, además de un dominio de señalización (p. ej., un dominio de señalización CD3 ζ).

En algunas realizaciones, el resto de activación celular del receptor de antígenos quimérico es un dominio de

señalización de linfocitos T que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en, una o más proteínas o fragmentos de las mismas seleccionados del grupo que consiste en proteína CD8, proteína CD28, proteína 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD27, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y proteína CD3-zeta.

En realizaciones específicas, el CAR comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o incluso consiste en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3 (por ejemplo, un scFv), un dominio de bisagra, un dominio transmembrana de CD28, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta. En realizaciones adicionales, la región de señalización coestimuladora comprende una o ambas, una región de señalización coestimuladora de CD28 y una región de señalización coestimuladora de 4-1BB.

Mecanismos de interrupción. En algunas realizaciones, el CAR también puede comprender un mecanismo de interrupción para controlar la expresión y/o activación del CAR. Por ejemplo, un CAR puede comprender, consistir, o consistir esencialmente en un dominio extracelular, transmembrana e intracelular, en el que el dominio extracelular comprende un elemento de unión específico de diana que se une a un marcador, dominio de unión o etiqueta que es específico para una molécula distinta del antígeno diana que se expresa en o por una célula diana. En dichas realizaciones, la especificidad del CAR está proporcionada por una segunda construcción que comprende, consiste o consiste esencialmente en un dominio de unión a antígeno diana (p. ej., un anticuerpo anti-FLT3 o un fragmento

de unión a antígeno del mismo o un anticuerpo biespecífico que se une a FLT3 y el marcador o etiqueta en el CAR) y un dominio que es reconocido por o se une al marcador, dominio de unión, o etiqueta en el CAR. Véanse, p.ej., los documentos WO 2013/044225, WO 2016/000304, WO 2015/057834, WO 2015/057852, WO 2016/070061, US 9233125, US 2016/0129109. De esta forma, la célula que expresa el CAR se puede administrar a un sujeto, pero no puede unirse a su antígeno diana (es decir, FLT3) hasta que se administre la segunda composición que comprende un dominio de unión específico de FLT3.

Los CAR de la presente divulgación también pueden requerir multimerización para activar su función (véanse, p.ej., el documento US 2015/0368342, el documento US 2016/0175359, el documento US 2015/0368360) y/o una señal exógena, tal como un fármaco de molécula pequeña (documento US 2016/0166613, Yung *et al.*, Science, 2015) para provocar una respuesta de linfocitos T.

Asimismo, los CAR divulgados pueden comprender un "interruptor suicida" (también denominado "gen suicida") para inducir la muerte celular de las células con CAR después del tratamiento (Buddee *et al.*, PLoS One, 2013) o para regular negativamente la expresión del CAR después de la unión al antígeno diana (documento WO 2016/011210). Un interruptor suicida o gen suicida ilustrativo no limitante es iCasp. El interruptor suicida puede estar bajo la dirección de un promotor inducible.

En un aspecto, el CAR de la presente divulgación puede además comprender, o de forma alternativa consistir

esencialmente en, o incluso consistir además en un elemento inducible o uno constitutivamente activo. En una realización, el elemento inducible o el constitutivamente activo controla la expresión de un polinucleótido que codifica una molécula inmunorreguladora o una citocina. La molécula inmunorreguladora o citocina puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en una o más de B7.1, CCL19, CCL21, CD40L, CD137L, GITRL, GM-CSF, IL-12, IL-2, IL-2 de baja toxicidad, IL-15, IL-18, IL-21, LEC y/o OX40L. En otro aspecto, la molécula inmunorreguladora o citocina puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en IL-12 y/o GM-CSF; y/o IL-12 y/o uno o más de IL-2 e IL-2 de baja toxicidad; y/o IL-12 y/o IL-15; y/o IL-12 y/o IL-21; IL-12 y/o B7.1; y/o IL-12 y/o OX40L; y/o IL-12 y/o CD40L; y/o IL-12 y/o GITRL; y/o IL-12 y/o IL-18; y/o una o más de IL-2 e IL-2 de baja toxicidad y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o IL-15 y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o IL-21 y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o GM-CSF y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o OX40L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o CD137L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o comprende B7.1 y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o CD40L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o GITRL y una o más de CCL19, CCL21 y LEC.

25

En algunas realizaciones, el CAR puede comprender además un marcador detectable o un marcador de purificación. En otro aspecto, los CAR como se describen en el presente documento se encuentran en una composición, p.ej., un transportador farmacéuticamente aceptable para diagnóstico o terapia.

30

Anticuerpos y proceso para preparar anticuerpos de FLT3, PD-1 y PD-L1

En el presente documento también se proporcionan anticuerpos que comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente en, o que incluso consisten además en una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia de aminoácidos (Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E W M G G I N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A Y M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K R) o un equivalente de la misma. En un aspecto, el anticuerpo que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) está codificado por la secuencia de nucleótidos que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia de ácido nucleico:

(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTTCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTCCAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAACGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACCTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATGGAACCTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATCGCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTGAGGTGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC

CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
 ATGTGTCAACCGCTGTGCGCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
 CTA CT CAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG
 ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC

5 AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)

o un equivalente de la misma. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno tiene una afinidad de unión a PD-1 que es al menos aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 veces mayor que su afinidad de unión por una molécula no relacionada con el PD-1.

10 En el presente documento también se describen anticuerpos que comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente en, o que incluso consisten además en una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso

15 consiste además en una secuencia de aminoácidos:

(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWQGTLVTVSAGGG
 GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPR
 LLIYLA SYLESGV PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGG TKVEI

20 K), o un equivalente de la misma. En un aspecto, el anticuerpo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) codificada por la secuencia de nucleótidos que comprende, o que de forma alternativa consiste

25 esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia de ácido nucleico:

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
 TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTATGC

30 TGATTCAGTAAAAGGACGGTTCCTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
 CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC

CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
 CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT

5 TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG
 TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
 ATTGCCAACATTACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA
 A), o un equivalente de la misma. En un aspecto, el dominio de
 unión a antígeno tiene una afinidad de unión a PD-L1 que es al
 10 menos aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 veces mayor que su
 afinidad de unión por una molécula no relacionada con el PD-
 L1.

En el presente documento también se describe un anticuerpo
 15 biespecífico que comprende, o que de forma alternativa consiste
 esencialmente en, o que incluso consiste además en una
 secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) que
 comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente
 en, o que incluso consiste además en una secuencia de
 20 aminoácidos: (Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A
 S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E W M G G I N P S N
 G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A Y M E L K S L
 Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T
 V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A
 25 S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P
 K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I
 S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I
 K R) y/o,
 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
 30 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTSAGGG
 GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGGEAPR

LLIYLASYLESQVPRFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEI

K), o un equivalente de cada una de las mismas. En un aspecto, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en una

5 secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) codificada por la secuencia de nucleótidos que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia de ácido nucleico:

(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT

10 TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC

CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA

CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG

GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC

GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG

15 TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC

CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG

ATGTGTCAACCGCTGTGCGCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT

CTACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG

ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCCTTGACGCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC

20 AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)

y/o,

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG

TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC

CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTATGC

25 TGATTCAGTAAAAGGACGGTTCCTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT

CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC

CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG

CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC

ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA

30 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT

TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG

TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
ATTGCCAACATTACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA

A) o un equivalente de cada una de las mismas. En un aspecto,
el dominio de unión a antígeno tiene una afinidad de unión a
5 PD-1 y/o PD-L1 que es al menos aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , o
 10^9 veces mayor que su afinidad de unión por una molécula no
relacionada con PD-1 y/o PD-L1. El anticuerpo puede ser un
anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En un aspecto particular,
el anticuerpo comprende, o de forma alternativa consiste
10 esencialmente en, o incluso consiste además en una región
constante. La región constante puede comprender, o de forma
alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir
además en una región constante de IgA, una de IgD, una de IgE,
una de IgG o una de IgM. En algunas realizaciones, la región
15 constante es una región constante de IgG1 o una región
constante de Ig kappa. En determinadas realizaciones, las
regiones constantes comprenden, o de forma alternativa
consisten esencialmente en, o incluso consisten además en las
secuencias de aminoácidos que se proporcionan a continuación:

20

Región constante de IgD humana, UniProt: P01880

APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMGTSQSPQRTFPEIQRRD
SYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSL
AKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEEKEERETKTPECPSTQPLGVYLLTPAVQDLWLR
25 DKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAG
TSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNIL
LMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLL
NASRSLEVSyvTDHGPMK

30

Región constante de IgG1 humana, UniProt: P01857

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 5 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de IgG2 humana, UniProt: P01859

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF
 10 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
 VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 Región constante de IgG3 humana, UniProt: P01860

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDT
 PPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWL
 20 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRF
 TQKSLSLSPGK

Región constante de IgM humana, UniProt: P01871

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSVLR
 GGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVLPVIAELPPKVSFVPPRDG
 FFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLT
 IKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTC
 LVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWSGERFTCTV
 30 THTDLPSPKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV FVQWM
 QRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVAHEALPNRV TERT

VDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

Región constante de IgG4 humana, UniProt: P01861

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 5 LYSLSSTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
 SVMHEALHNYHTQKSLSLSLGK

10

Región constante de IgA1 humana, UniProt: P01876

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQVTARNFPPSQDASG
 DLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPCVPSTPPTPSPSTPPTPSPSC
 CHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCY
 15 SVSSVLPGCAEPWNHGKFTTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNE
 LVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTTFAVTSILRVAEDW
 KKGDTFSCMGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

Región constante de IgA2 humana, UniProt: P01877

20 ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVARNFPPSQDASG
 DLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPPPPPCCHPRLSLHRPALE
 DLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQPW
 NHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSP
 KDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTTFAVTSILRVAEDWKKGDTFSCMGHE
 25 ALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

Región constante kappa de Ig humana, UniProt: P01834

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

La presente divulgación también se refiere a anticuerpos

que compiten por unirse con los anticuerpos descritos en el presente documento. El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal o humanizado. En el presente documento también se proporcionan los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de la presente divulgación. El fragmento de unión a antígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab', scFv y Fv. En un aspecto, el fragmento de unión a antígeno puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en una secuencia de aminoácidos (Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E W M G G I N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A Y M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K R), o un equivalente de la misma. El fragmento de unión a antígeno puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia de ácido nucleico:

```
(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT
TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC
CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA
CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACCTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG
GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC
GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG
TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC
CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
```

ATGTGTCAACCGCTGTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
 CTA CT CAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG
 ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC
 AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG),

5 o un equivalente de cada una de las mismas. En otro aspecto,
 el fragmento de unión a antígeno puede comprender, o de forma
 alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir
 además en una secuencia de aminoácidos:

(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
 10 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWQGGLVTVSAGGG
 GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPR
 LLIYLA SYLES GVPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEI
 K), o un equivalente de cada una de las mismas. El fragmento

de unión a antígeno puede estar codificado por la secuencia de
 15 nucleótidos que comprende, o de forma alternativa consiste
 esencialmente en, o que incluso consiste además en una
 secuencia de ácido nucleico:

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
 TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
 20 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTATGC
 TGATT CAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
 CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC
 CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
 CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
 25 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
 TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG
 TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
 ATTGCCAACATTACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA

30 A) o un equivalente de cada una de las mismas. En el presente
 documento también se describen polipéptidos que comprenden, o

que de forma alternativa consisten esencialmente en, o que incluso consisten además en una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de: 45 (Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E W M G G I

5 N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A Y M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F

10 T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K R) o

(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LVTVSAGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPR

15 LLIYLA S Y L E S G V P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q H S R D L P L T F G G G T K V E I

K), o un equivalente de cada una de ellas. La presente divulgación se refiere además a ácidos nucleicos aislados que comprenden, o de forma alternativa consisten esencialmente en, o incluso consisten además en una secuencia de ácido nucleico

de una cualquiera de:

(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAAC T G A C T C A A G T A C G A C T A C A G C A T A C A T G

25 G A A C T C A A A T C T C T C C A A T T C G A T G A C A C G G C T G T C T A T T A T T G C G C G A G A A G A G A C T A T C G C T T C G A T A T G G G G T T T G A T T A T T G G G G G C A A G G T A C T A C G G T T A C C G T C A G C T C C G G G G T G G C G G C T C C G G C G G C G G T G G G T C A G G T G G A G G A G G G T C T G A C A T T C A G A T G A C G C A A T C C C A A G C T C T C T G T C C G C G T C A G T G G G C G A C C G A G T T A C A A T C A C A T G C C G C G C T T C T C A A G

30 A T G T G T C A A C C G C T G T C G C C T G G T A C C A A C A G A A G C C T G G G A A G G C C C T A A G C T T C T C A T C T A C T C A G C T T C T T T T C T G T A C T C A G G G G T A C C G T C T A G A T T C T C A G G A T C C G G T A G T G G G A C G G A C T T C A C A T T G A C C A T A A G T T C C T T G C A G C C T G A G G A T T T C G C T A C A T A T T A T T G C C

AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)

0

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG

TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC

5 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTATGC

TGATTTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT

CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC

CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG

CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC

10 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA

GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT

TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG

TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT

ATTGCCAACATTCACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA

15 A), o un equivalente de cada una de ellas.

En el presente documento también se proporcionan células aisladas que comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente en, o que consisten en los anticuerpos de la presente divulgación. En un aspecto, los anticuerpos de la presente divulgación se expresan en células aisladas. La célula puede ser una célula procariota o eucariota, y opcionalmente se selecciona de una célula animal, una célula de mamífero, una célula bovina, una célula felina, una célula canina, una célula murina, una célula equina o una célula humana. En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula inmunitaria, opcionalmente un linfocito T, un linfocito B, una célula NK, una célula dendrítica, una célula mieloide, un monocito o un macrófago. En realizaciones adicionales, la célula inmunitaria es un linfocito T, que puede modificarse opcionalmente para suprimir la expresión de TCR endógeno,

utilizando cualquier sistema apropiado, por ejemplo, un sistema CRISPR. En cualquiera de las realizaciones anteriores relacionadas con una célula aislada, la célula aislada expresa el CAR en la superficie celular y secreta el anticuerpo que
5 comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, opcionalmente el anticuerpo biespecífico.

Los anticuerpos para usar en la presente divulgación se
10 pueden adquirir o preparar usando métodos conocidos en la materia y descritos brevemente en el presente documento. En algún aspecto, puede ser deseable producir un anticuerpo que sea específico para un antígeno expresado por la célula diana que se ha aislado del paciente para una terapia personalizada
15 especializada. Su fabricación y usos son bien conocidos y se divulgan en, por ejemplo, Greenfield (2014) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Los anticuerpos se pueden generar usando métodos estándar conocidos en la materia. Ejemplos de
20 anticuerpos incluyen, pero sin limitación, fragmentos de anticuerpos monoclonales, monocatenarios y funcionales.

Los anticuerpos pueden producirse en una variedad de hospedadores, por ejemplo, cabras, conejos, ratas, ratones,
25 seres humanos y otros. Pueden inmunizarse mediante inyección con un antígeno diana o un fragmento u oligopéptido del mismo que tenga propiedades inmunogénicas, tales como un fragmento C-terminal de FLT3, PD-1 o PD-L1 o un polipéptido aislado. Dependiendo de la especie hospedadora, se pueden añadir y
30 utilizar varios adyuvantes para aumentar una respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación,

de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. Entre los
5 adyuvantes utilizados en seres humanos, BCG (bacilo de Calmette-Guérin) y *Corynebacterium parvum* son particularmente útiles. La presente divulgación también proporciona el polipéptido aislado y un adyuvante.

10 En determinados aspectos, los anticuerpos de la presente divulgación son policlonales, es decir, una mezcla de varios tipos de anticuerpos de FLT3, PD-1 o PD-L1 que tienen diferentes secuencias de aminoácidos. En un aspecto, el anticuerpo policlonal comprende una mezcla de varios tipos de
15 anticuerpos de FLT3, PD-1 o PD-L1 que tienen diferentes CDR. Como tal, se cultiva una mezcla de células que producen diferentes anticuerpos, y se puede usar un anticuerpo purificado del cultivo resultante (véase el documento WO 2004/061104).

20 *Monoclonal Antibody Production.* Los anticuerpos monoclonales contra el antígeno FLT3, PD-1 o PD-L1 se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas
25 en cultivo y en un aspecto, se generan para unirse especialmente a un antígeno aislado del sujeto a tratar. Tales técnicas incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497); la técnica de trioma; la técnica de hibridoma de
30 linfocitos B humanos (véase, por ejemplo, Kozbor *et al.* (1983) Immunol. Today 4: 72) y la técnica de hibridoma de EBV para

producir anticuerpos monoclonales humanos (véase, por ejemplo, Cole *et al.* (1985) en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden utilizar en la práctica de la presente técnica y se pueden producir mediante el uso de hibridomas humanos (véase, por ejemplo, Cote *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 2026-2030) o mediante la transformación *in vitro* de linfocitos B humanos con el virus de Epstein-Barr (véase, por ejemplo, Cole *et al.* (1985) en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Por ejemplo, se puede aislar una población de ácidos nucleicos que codifican regiones de anticuerpos. La PCR que utiliza cebadores procedentes de secuencias que codifican regiones conservadas de anticuerpos se utiliza para amplificar secuencias que codifican porciones de anticuerpos de la población y a continuación reconstruir ADN que codifica anticuerpos o fragmentos de los mismos, tales como dominios variables, de las secuencias amplificadas. Dichas secuencias amplificadas también se pueden fusionar con ADN que codifican otras proteínas, por ejemplo, una proteína de la cubierta de un bacteriófago, o de la superficie de una célula bacteriana, para la expresión y presentación de los polipéptidos de fusión en bacteriófagos o bacterias. Las secuencias amplificadas se pueden expresar entonces y además seleccionar o aislar basándose, por ejemplo, en la afinidad del anticuerpo expresado o de un fragmento de unión a antígeno del mismo por un antígeno o epítipo presente en el polipéptido del antígeno FLT3, PD-1 o PD-L1. Alternativamente, los hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales de FLT3 se pueden preparar mediante la inmunización de un sujeto, por ejemplo, con un polipéptido aislado que comprende, o que de forma alternativa consiste

esencialmente en, o que incluso consiste además en, la
secuencia de aminoácidos del antígeno FLT3, PD-1, o PD-L1 o un
fragmento del mismo, y a continuación aislar hibridomas del
bazo del sujeto usando métodos rutinarios. Véase, por ejemplo,
5 Milstein *et al.*, (Galfre y Milstein (1981) *Methods Enzymol*
73:3-46). La selección de los hibridomas mediante métodos
estándar producirá anticuerpos monoclonales de afinidad y
especificidad variable (es decir, para diferentes epítomos).
Un anticuerpo monoclonal seleccionado con las propiedades
10 deseadas, por ejemplo, que se une al antígeno FLT3 PD-1 o PD-
L1, se puede (i) usar como lo expresa el hibridoma, (ii) unir
a una molécula tal como polietilenglicol (PEG) para alterar
sus propiedades, o (iii) puede aislar un ADNc que codifica la
secuencia de ácido nucleico del anticuerpo monoclonal,
15 secuenciado y manipulado de diversas formas. En un aspecto, el
anticuerpo monoclonal FLT3 se produce por un hibridoma que
incluye un linfocito B obtenido a partir de un animal
transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que
tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y
20 un transgén de cadena ligera humanas fusionados a una célula
inmortalizada. Las técnicas de hibridoma incluyen las conocidas
en la materia y enseñadas en Greenfield (2014) *Antibodies: A*
Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
Harbor, N.Y.; Hammerling *et al.* (1981) *Monoclonal Antibodies*
25 *And T-Cell Hybridomas*:563-681.

Técnica de presentación en bacteriófagos. Como se ha
indicado anteriormente, los anticuerpos de la presente
divulgación se pueden producir mediante la aplicación de ADN
30 recombinante y tecnología de presentación en bacteriófagos.
Por ejemplo, los anticuerpos de FLT3, PD-1 o PD-L1 se pueden

preparar usando varios métodos de presentación en bacteriófagos conocidos en la materia. En los métodos de presentación en bacteriófagos, los dominios funcionales del anticuerpo se presentan en la superficie de una partícula de bacteriófago que porta secuencias polinucleotídicas que los codifican. El bacteriófago con una propiedad de unión deseada se selecciona de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos) mediante la selección directamente con un antígeno, normalmente un antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los bacteriófagos utilizados en estos métodos son normalmente bacteriófagos filamentosos incluyendo fd y M13 con dominios de anticuerpo Fab, F_v o F_v estabilizado con disulfuro que se fusionan de forma recombinante con la proteína del gen III o del gen VIII del bacteriófago. Además, los métodos se pueden adaptar para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase, por ejemplo, Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para el polipéptido FLT3, por ejemplo, un polipéptido o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo. Otros ejemplos de métodos de presentación en bacteriófagos que se pueden usar para preparar los anticuerpos aislados de la presente divulgación incluyen los divulgados en Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883; Chaudhary *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:1066-1070; Brinkman *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic *et al.* (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton *et al.* (1994) *Advances in Immunology* 57:191-280; el documento PCT/GB91/01134; el documento WO 90/02809; el documento WO

91/10737; el documento WO 92/01047; el documento WO 92/18619; el documento WO 93/11236; el documento WO 95/15982; el documento WO 95/20401; el documento WO 96/06213; el documento WO 92/01047 (Medical Research Council *et al.*); el documento WO 97/08320 (Morphosys); el documento WO 92/01047 (CAT/MRC); el documento WO 91/17271 (Affymax); y las patentes de Estados Unidos n.º 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727 y 5.733.743.

10

Se ha descrito métodos útiles para mostrar polipéptidos en la superficie de partículas de bacteriófagos mediante la unión de los polipéptidos *a través de* enlaces disulfuro por Lohning, patente de Estados Unidos n.º 6.753.136. Como se describe en la bibliografía anterior, después de la selección de bacteriófagos, las regiones codificantes de anticuerpos del bacteriófago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la materia tales como los divulgados en el documento WO 92/22324; Mullinax *et al.* (1992) BioTechniques 12:864-869; Sawai *et al.* (1995) AJRI 34:26-34; y Better *et al.* (1988) Science 240:1041-1043.

Generalmente, los anticuerpos híbridos o los fragmentos de anticuerpos híbridos que se clonan en un vector de presentación pueden seleccionarse contra el antígeno apropiado

30

para identificar variantes que mantengan una buena actividad de unión, porque el anticuerpo o fragmento de anticuerpo estará presente en la superficie del bacteriófago o partícula fagómido. Véase, por ejemplo, Barbas III *et al.* (2001) Phage Display, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Sin embargo, se podrían utilizar otros formatos vectoriales para este proceso, tales como la clonación de la biblioteca de fragmentos de anticuerpos en un vector de bacteriófago lítico (sistemas T7 o Lambda Zap modificados) para selección y/o cribado.

Métodos alternativos de producción de anticuerpos. Los anticuerpos también se pueden producir mediante la inducción *in vivo* de la producción en la población de linfocitos o mediante la selección de bibliotecas de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos (Orlandi *et al.* (1989) PNAS 86:3833-3837; Winter, G. *et al.* (1991) Nature 349:293-299).

Alternativamente, pueden usarse técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios (scFv) comprenden una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera conectada con un péptido enlazador (normalmente alrededor de 5 a 25 aminoácidos de longitud). En el scFv, las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden proceder del mismo anticuerpo o de diferentes anticuerpos. Los scFv se pueden sintetizar utilizando técnicas recombinantes, por ejemplo, mediante la expresión de un vector que codifica la secuencia de ácido nucleico del scFv en un organismo hospedador tal como *E. coli*. El ADN que codifica la secuencia de ácido nucleico

del scFv puede obtenerse mediante la realización de una
amplificación usando un ADN parcial que codifica la secuencia
de aminoácidos completa o una deseada de un ADN seleccionado
de un ADN que codifica la cadena pesada o la región variable
5 de la cadena pesada del anticuerpo mencionado anteriormente y
un ADN que codifica la cadena ligera o la región variable
de la cadena ligera del mismo como plantilla, mediante PCR
usando un par de cebadores que define ambos extremos del mismo,
y mediante la realización además de la amplificación combinando
10 un ADN que codifica una porción de enlazador polipeptídico y
un par de cebadores que define ambos extremos del mismo, para
ligar así ambos extremos del enlazador a la cadena pesada y la
cadena ligera, respectivamente. Se puede obtener un vector de
expresión que contiene el ADN que codifica la secuencia de
15 ácido nucleico del scFv y un hospedador transformado por el
vector de expresión de acuerdo con métodos convencionales
conocidos en la materia.

También se pueden generar fragmentos de unión a antígeno,
20 por ejemplo, fragmentos $F(ab')_2$ que se pueden producir mediante
digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y fragmentos
Fab que se pueden generar mediante la reducción de los puentes
disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Alternativamente, se
pueden construir bibliotecas de expresión de Fab para permitir
25 una identificación rápida y fácil de fragmentos de Fab
monoclonales con la especificidad deseada (Huse *et al.*,
Science, 256: 1275-1281 (1989)).

Anticuerpos disponibles comercialmente. Los anticuerpos
30 también se pueden adquirir de fuentes comercialmente
disponibles. Ejemplos de anticuerpos de FLT3 disponibles

comercialmente incluyen, pero sin limitación, los producidos por proveedores tales como Proteintech Group Inc., eBioscience, Abgent, Aviva Systems Biology, Becton Dickinson (Biosciences), Cell Signaling Technology, Fitzgerald Industries International, United States Biological, Biorbyt, Abbexa, Abgent, LifeSpan BioSciences, antibodies-online, Rockland Immunochemicals, Inc., OriGene Technologies, GeneTex, Raybiotech, Inc., Acris Antibodies GmbH, Sino Biological, MyBioSource.com, Bioss Inc., St. John's Laboratory, Source BioScicne, Abcam, ProSci, Inc., Clinic Sciences, Novus Biologicals, Creative Diagnostics, Thermo Scientific Pierce Antibodies, PeproTech, MBL International, Miltenyi Biotec, GenWay Biotech, Inc., LifeSpan Biosciences, Bioworld Technology, EXBIO Praha, a.s., Novus Biologicals, BioVision, Bethyl Laboratories, Santa Crus Biotechnology Inc., AcD Serotec, BioRad, BioLegend, Thermo Fisher Scientific, EMD Milipore, R&D Systems, Cell Sciences, Progen Biotechnik GmbH, Spring Bioscience, Atlas Antibodies, Abbiotec, Bostrebio, Nordic BioSite y otros fabricantes de anticuerpos comúnmente conocidos. Ejemplos no limitantes de anticuerpos de FLT3 disponibles comercialmente incluyen aquellos de clones BV10 y 4G8 y equivalentes biológicos o versiones modificadas de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, los siguientes anticuerpos disponibles comercialmente enumerados por proveedor y número de catálogo: antibodies-online ABIN487499, antibodies-online ABIN487500, LifeSpan Biosciences LS-C179623-100, LifeSpan Biosciences LS-C179624-50, Acris Antibodies AM20042AF-N, Acris Antibodies AM20042FC-N, MBL International K0107-3, MBL International K0107-4, Novus Biologicals NBP1-54522-0,05 mg, Novus Biologicals NBP1-54414, Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-21788, Becton Dickinson Biosciences

564708, Becton Dickinson Biosciences 563494. Otros anticuerpos de ejemplo disponibles comercialmente incluyen todos los anticuerpos enumerados como reactivos contra FLT3 humano en Biocompare o en otra base de datos de anticuerpos disponibles comercialmente; ejemplos no limitantes incluyen los divulgados en el presente documento, enumerados por proveedor y número de catálogo Proteintech Group Inc. 21049-1-AP, Proteintech Group Inc. 15827-1-AP, Proteintech Group Inc. 15826-1-AP, eBioscience 17-1357-41, eBioscience 12-1357-41, eBioscience 14-1357-80, eBioscience 17-1357-42, eBioscience 12-1357-42, eBioscience 14-1357-82, Abgent AP7644a, Abgent AP3068a, Aviva Systems Biology OAAB17159, Aviva Systems Biology OAAF00442, Aviva Systems Biology ARP30009_T100, Aviva Systems Biology ARP30010_P050, Cell Signaling Technology 3462S, Cell Signaling Technology 3464S, Cell Signaling Technology 3474S, Cell Signaling Technology 3466S, Cell Signaling Technology 3461S, Cell Signaling Technology 3461L, Cell Signaling Technology 3463S, Cell Signaling Technology 4577S, Fitzgerald Industries International 20R-2351, Fitzgerald Industries International 70R-12259, Fitzgerald Industries International 70R-17325. Los anticuerpos disponibles comercialmente para PD-1 y PD-L1 están disponibles. Véase, por ejemplo, [biocompare.com/pfu/110447/soids/531283/Antibodies/PD1](https://www.biocompare.com/pfu/110447/soids/531283/Antibodies/PD1) (que describe fuentes comerciales de anticuerpos anti-PD-1; última consulta el 3 de julio de 2019) y [biocompare.com/pfu/110447/soids/592604/Antibodies/PDL1](https://www.biocompare.com/pfu/110447/soids/592604/Antibodies/PDL1) (que describe fuentes comerciales de anticuerpos anti-PD-L1; última consulta el 3 de julio de 2019). Un experto en la materia puede detectar la expresión de FLT3, PD-1 y/o PD-L1 utilizando métodos tales como secuenciación de ARN, micromatrices de ADN, PCR en tiempo real o inmunoprecipitación de cromatina (ChIP,

por sus siglas en inglés), etc. La expresión de proteínas se puede controlar usando métodos tales como la citometría de flujo, análisis por transferencia de Western, electroforesis en gel bidimensional, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) u otros inmunoensayos, etc.

Equivalentes de anticuerpos. La presente divulgación proporciona "equivalentes" o "equivalentes biológicos" de los anticuerpos divulgados anteriormente, en donde un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo que es al menos un 80 %, o alternativamente un 85 %, o alternativamente un 90 %, o alternativamente un 95 %, o alternativamente al menos un 97 %, idéntico al dominio de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos divulgados anteriormente se convierte en el equivalente biológico del anticuerpo divulgado anteriormente. Ejemplos adicionales de equivalentes incluyen un polipéptido que está codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad con el complemento de un polinucleótido que codifica la secuencia de ácido nucleico del dominio de unión a antígeno de uno cualquiera de los anticuerpos divulgados anteriormente, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente el 55 % a aproximadamente el 75 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0,1x SSC, o agua desionizada.

Modificaciones de anticuerpos. Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden multimerizar para aumentar la afinidad por un antígeno. El anticuerpo a multimerizar puede

ser un tipo de anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos que reconocen una pluralidad de epítomos del mismo antígeno. Se puede ejemplificar como método de multimerización del anticuerpo, la unión del dominio CH3 de IgG a dos moléculas scFv, la unión a estreptavidina, la introducción de un motivo de hélice-vuelta-hélice y similares.

Las composiciones de anticuerpos divulgadas en el presente documento pueden estar en forma de un conjugado formado entre cualquiera de estos anticuerpos y otro agente (inmunoconjugado). En un aspecto, los anticuerpos divulgados en el presente documento se conjugan con material radiactivo. En otro aspecto, los anticuerpos divulgados en el presente documento se pueden unir a varios tipos de moléculas tales como polietilenglicol (PEG).

Selección de anticuerpos. Se pueden usar diversos inmunoensayos para la selección para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para ensayos de unión competitiva o inmunorradiométricos que usan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas son bien conocidos en la materia. Dichos inmunoensayos normalmente implican la medición de la formación de complejos entre el antígeno FLT3, PD-1 o PD-L1, o cualquier fragmento u oligopéptido del mismo y su anticuerpo específico. Se puede utilizar un inmunoensayo monoclonal de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales específicos para dos epítomos de antígeno FLT3, PD-1 o PD-L1 no de interferencia, pero también se puede emplear un ensayo de unión competitiva (Maddox *et al.* (1983) J. Exp. Med. 158:1211-1216).

Purificación de anticuerpos. Los anticuerpos divulgados en el presente documento se pueden purificar hasta la homogeneidad. La separación y purificación de los anticuerpos se puede realizar mediante el empleo de métodos convencionales de separación y purificación de proteínas.

Solamente a modo de ejemplo, el anticuerpo puede separarse y purificarse mediante la selección y combinación apropiada del uso de columnas de cromatografía, filtros, ultrafiltración, precipitación de sal, diálisis, electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, electroforesis de enfoque isoelectrico y similares. *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Daniel R. Marshak *et al.* eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Ejemplos de cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción. En un aspecto, la cromatografía se puede realizar mediante el empleo de cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

En un aspecto, se puede usar una columna de proteína A o una columna de proteína G en cromatografía de afinidad. Otras columnas de ejemplo incluyen una columna de Proteína A, Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia) y similares.

Ácidos nucleicos aislados y procesos para la preparación de CAR

Aspectos adicionales se refieren a un ácido nucleico aislado que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; un dominio de bisagra; un dominio transmembrana, por ejemplo, un dominio transmembrana CD28; una o más regiones coestimuladoras, por ejemplo, seleccionada de una región de señalización coestimuladora CD28, una región de señalización coestimuladora 4-1BB, una región de señalización coestimuladora ICOS y una región coestimuladora OX40; y un dominio de señalización CD3 zeta.

Sin quedar unidos a la teoría, aspectos adicionales contemplan que un ácido nucleico aislado comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, el dominio de unión de un ligando para una molécula exógena (es decir, no FLT3); un dominio de bisagra; un dominio transmembrana, por ejemplo, un dominio transmembrana CD28; una o más regiones coestimuladoras, por ejemplo, seleccionada de una región de señalización coestimuladora CD28, una región de señalización coestimuladora 4-1BB, una región de señalización coestimuladora ICOS y una región coestimuladora OX40; y un dominio de señalización CD3 zeta. En dichos aspectos adicionales, el dominio de unión de un ligando para una molécula exógena reconoce y se une a un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3 unido operativamente a la molécula exógena; generando así un CAR de FLT3.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado

comprende además, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de ácido nucleico de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que reconoce y se une opcionalmente a PD-1 y/o PD-L1. En otras realizaciones, se proporciona un segundo ácido nucleico aislado que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de ácido nucleico de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que reconoce y se une opcionalmente a PD-1 y/o PD-L1. En cualquiera de estas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o consistir además en un antagonista o agonista de PD-1 y/o un antagonista o agonista de PD-L1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y/o uno equivalente

de cada uno de los mismos. En algunas realizaciones, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia polinucleotídica:

5 Secuencia polinucleotídica de scFv del anticuerpo anti-PD-1:

CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTTT
CTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTCC
AGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAAC
10 GAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAAGTCAAGTACGACTACAGCATACATGG
AACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATCG
CTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGT
GGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCC
CAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGA
15 TGTGTCAACCGCTGTGCGCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCATC
TACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGA
CGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCCA
ACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG, o
un equivalente de la misma.

20

 Secuencia de aminoácidos de scFv del anticuerpo anti-PD-1:

Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N
Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E W M G G I N P S N G G T N F N E
25 K F K N R V T L T T D S S T T T A Y M E L K S L Q F D D T A V
Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G
S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A
S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D
30 F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K R, o un
equivalente de la misma.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo PD-L1. En algunas realizaciones, el
 5 scFv comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia polinucleotídica:

Secuencia polinucleotídica de scFv del anticuerpo anti-PD-L1:

10 GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTGT
 CCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCCC
 GGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTATGCT
 GATTGAGTAAAAGGACGGTTCCTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTTC
 AAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGCC
 15 AGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGC
 AGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCA
 CATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAGGTGTCAG
 TACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTT
 CTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGT
 20 CTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTA
 TTGCCAACATTACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA
 , o un equivalente de la misma.

Secuencia de aminoácidos de scFv del anticuerpo anti-PD-
 25 L1:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYA
 DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWQGTLVTVSAGGGG
 SGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPRL
 LIYLAASYLESQVPAARFSGSGSDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK
 30 , o un equivalente de la misma.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo biespecífico. En determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada una de las mismas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y/o uno equivalente de cada uno de los mismos.

En el presente documento se proporciona un ácido nucleico aislado o un vector que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en: un polinucleótido que codifica un receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en: (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3;

(b) un dominio de bisagra; (c) un dominio transmembrana; (d) y un dominio intracelular; y un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1.

El ácido nucleico aislado o vector divulgados anteriormente que codifican el CAR puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en cualquier CAR divulgado en el presente documento. En un aspecto, el ácido nucleico aislado o el vector de la presente divulgación que codifica el CAR comprende además, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un dominio de señalización. En otro aspecto, el ácido nucleico aislado o el vector que codifica el CAR puede comprender además, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en un elemento inducible o constitutivamente activo. En una realización, el elemento inducible o el constitutivamente activo controla la expresión de un polinucleótido que codifica una molécula inmunorreguladora o una citocina. La molécula inmunorreguladora o citocina puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en una o más de B7.1, CCL19, CCL21, CD40L, CD137L, GITRL, GM-CSF, IL-12, IL-2, IL-2 de baja toxicidad, IL-15, IL-18, IL-21, LEC y/o OX40L. En otro aspecto, la molécula inmunorreguladora o citocina puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en IL-12 y/o GM-CSF; y/o IL-12 y/o uno o más de IL-2 e IL-2 de baja toxicidad; y/o IL-12 y/o IL-15; y/o IL-12 y/o IL-

21; IL-12 y/o B7.1; y/o IL-12 y/o OX40L; y/o IL-12 y/o CD40L;
 y/o IL-12 y/o GITRL; y/o IL-12 y/o IL-18; y/o una o más de IL-2
 e IL-2 de baja toxicidad y una o más de CCL19, CCL21 y LEC;
 y/o IL-15 y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o IL-21 y una o
 5 más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o GM-CSF y una o más de CCL19,
 CCL21 y LEC; y/o OX40L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o
 CD137L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o comprende B7.1 y
 una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o CD40L y una o más de
 CCL19, CCL21 y LEC; y/o GITRL y una o más de CCL19, CCL21 y
 10 LEC.

En una realización, el dominio de bisagra del ácido
 nucleico aislado o del vector que codifica el CAR comprende, o
 de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso
 15 consiste además en un dominio de bisagra CD8 α . En otro aspecto,
 el dominio transmembrana del ácido nucleico aislado o del
 vector que codifica el CAR comprende, o de forma alternativa
 consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un
 dominio transmembrana CD8 α . En un aspecto separado, la región
 20 de señalización coestimuladora del ácido nucleico aislado o
 del vector que codifica el CAR comprende, o de forma
 alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste
 además en una región de señalización coestimuladora CD28 y/o
 una región de señalización coestimuladora 4-1BB

25

En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado o el
 vector que codifica el CAR comprende, o de forma alternativa
 consiste esencialmente en, o incluso consiste además en: (a)
 un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; (b)
 30 un dominio de bisagra CD8 α ; (c) un dominio transmembrana CD8
 α ; y (d) una región de señalización coestimuladora CD28 y/o

una región de señalización coestimuladora 4-1BB. En otras realizaciones, el ácido nucleico aislado o el vector que codifica el CAR comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en: (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; (b) un dominio de bisagra CD8 α ; (c) un dominio transmembrana CD8 α ; (d) una región de señalización coestimuladora CD28 y/o una región de señalización coestimuladora 4-1BB; y (e) un dominio de señalización CD3 zeta.

10

Para cualquiera del ácido nucleico aislado o vector divulgados anteriormente, el dominio de unión a antígeno del anticuerpo de FLT3 del ácido nucleico aislado o el vector que codifica el CAR puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en una región variable de cadena pesada que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en:

20

una CDHR1 que tiene la secuencia de aminoácidos (SYWMH) o (NYGLH) o un equivalente de cada una de las mismas,

una CDHR2 que tiene la secuencia de aminoácidos (EIDPSDSYKDYNQKFKD) o (VIWSGGSTDYNAAFIS) o un equivalente de cada una de las mismas, y

25

una CDHR3 que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por (AITTTPFDF) o (GGIYYANHYYAMDY) o un equivalente de cada una de las mismas, y/o una región variable de cadena ligera que comprende:

una CDLR1 que tiene la secuencia de aminoácidos (RASQISISNNLH) o (KSSQSLLNSGNQKNYM) o un equivalente de cada una de las mismas,

30

una CDLR2 que tiene la secuencia de aminoácidos (YASQSIG) o (GASTRES) o un equivalente de cada una de las mismas, y

una CDLR3 que tiene la secuencia de aminoácidos (QQSNTWPYT) o (QNDHSYPLT) o un equivalente de cada una de las mismas.

Para cualquiera del ácido nucleico aislado o vector divulgados anteriormente, el dominio de unión a antígeno del ácido nucleico aislado o vector que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en un antagonista de PD-1 y/o un antagonista de PD-L1, y/o un equivalente de cada uno de los mismos. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en regiones CDR de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada una de las mismas. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en una región variable de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada una de las mismas. En un aspecto adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en un dominio

de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1, y/o un equivalente de cada uno de los mismos.

En una realización, el anticuerpo que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 es un anticuerpo biespecífico. En otra realización, el anticuerpo biespecífico de la misma comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un antagonista de PD-1 y un antagonista de PD-L1, y, opcionalmente, además comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un enlazador. En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico de la misma comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en regiones CDR de un anticuerpo contra PD-1 y PD-L1, y puede opcionalmente, comprender además, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en un enlazador. En un aspecto, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en una región variable de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y PD-L1 y, puede opcionalmente, comprender además, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en un enlazador. En otra realización, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y un fragmento

variable de cadena única (scFv) que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y, puede opcionalmente, comprender además, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso consistir además en un enlazador.

En una realización particular, el fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en la secuencia polinucleotídica:

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
 TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTATGC
 TGATTTCAGTAAAAGGACGGTTCCTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
 CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC
 CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
 CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
 TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG
 TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
 ATTGCCAACATTCACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTGAAATAAA
 A), o un equivalente de la misma. En aún otra realización, el fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en la secuencia polinucleotídica:

(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT
TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC
CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA
CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACCTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG
5 GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC
GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG
TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTGAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC
CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
ATGTGTCAACCGCTGTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
10 CTA CTACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG
ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC
AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG,
o un equivalente de la misma.

15 En un aspecto, el vector descrito en el presente documento
es un plásmido. En otro aspecto, el vector es un vector vírico
seleccionado de un vector retrovírico, un vector lentivírico,
un vector adenovírico o un vector vírico adenoasociado. En un
aspecto adicional, el vector es bicistrónico.

20

El ácido nucleico aislado o vector de la presente
divulgación puede además comprender, o de forma alternativa
consistir esencialmente en, o incluso consistir además en un
promotor y/o potenciador unido operativamente al
25 polinucleótido que codifica el anticuerpo o el fragmento de
unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1. En
algunas realizaciones, el promotor y/o potenciador unido
operativamente al polinucleótido que codifica el anticuerpo o
el fragmento de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1
30 y/o PD-L1 es un promotor de alta expresión. Ejemplos no
limitantes de promotores de alta expresión son el de

citomegalovirus (CMV), potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo (MND) y promotores EF1 alfa.

En determinadas realizaciones, se divulgan métodos para
5 producir células que expresan CAR de FLT3, comprendiendo el
método, o de forma alternativa consistiendo esencialmente en,
o incluso consistiendo además en transducir una población de
células aisladas con una secuencia de ácido nucleico que
codifica un CAR de FLT3 y una secuencia de ácido nucleico que
10 codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del
mismo, opcionalmente, un anticuerpo biespecífico, que,
opcionalmente, reconoce y se une PD-1 y/o PD-L1 o un
equivalente de cada uno de ellos. En un aspecto, el método de
producción de la célula que expresa CAR comprende, o de forma
15 alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste
además en transducir la célula aislada con el ácido nucleico
aislado o el vector de la presente divulgación. Las células
aisladas se pueden seleccionar de un grupo que consiste en
linfocitos T, linfocitos B, células NK, células dendríticas,
20 células mieloides, monocitos o macrófagos. En algunas
realizaciones, esto se logra mediante (i) el uso de un vector
que codifica la construcción del CAR de FLT3 y el anticuerpo o
fragmento de unión a antígeno del mismo o (ii) el uso de dos
vectores, uno que codifica el CAR de FLT3 y el otro que codifica
25 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En
algunas realizaciones, esto se logra mediante el uso de ARNm
que codifica la construcción del CAR de FLT3 y/o el anticuerpo
o fragmento de unión a antígeno del mismo, que a su vez puede
introducirse en las células mediante electroporación. Véase,
30 por ejemplo, Choi *et al.* (2010) Biomed Microdevices 12(5):855-
863. En un aspecto adicional, se selecciona una subpoblación

de células que se han transducido con éxito con dicha secuencia de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las células aisladas son linfocitos T, un linfocito T animal, un linfocito T de mamífero, un linfocito T felino, un linfocito T canino o un linfocito T humano, produciendo así linfocitos T con CAR de FLT3. En determinadas realizaciones, la célula aislada es una célula NK, por ejemplo, una célula NK animal, una célula NK de mamífero, una célula NK felina, una célula NK canina o una célula NK humana, produciendo así células NK con CAR de FLT3. En algunas realizaciones, las células aisladas son linfocitos B, un linfocito B animal, un linfocito B de mamífero, un linfocito B felino, un linfocito B canino o un linfocito B humano, produciendo así linfocitos B con CAR de FLT3.

Sin quedar unidos a la teoría, aspectos adicionales contemplan métodos de transducción de una célula con un ácido nucleico aislado que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en una secuencia que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, el dominio de unión de un ligando para una molécula exógena (es decir, no FLT3); un dominio de bisagra; un dominio transmembrana, por ejemplo, un dominio transmembrana CD28; una o más regiones coestimuladoras, por ejemplo, seleccionada de una región de señalización coestimuladora CD28, una región de señalización coestimuladora 4-1BB, una región de señalización coestimuladora ICOS y una región coestimuladora OX40; y un dominio de señalización CD3 zeta, es decir, una "célula con CAR universal". En dichos aspectos adicionales, el dominio de unión de un ligando para una molécula exógena que reconoce y la molécula exógena, que está unida operativamente a un dominio

de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3 se une operativamente; y, por lo tanto, se genera un CAR de FLT3 tras la introducción del dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3 unido operativamente a la molécula exógena.

- 5 En algunas realizaciones, la molécula exógena es biotina o estreptavidina.

En algunas realizaciones, los linfocitos T que expresan los CAR divulgados pueden modificarse adicionalmente para
10 reducir o eliminar la expresión de TCR endógenos. La reducción o eliminación de TCR endógenos puede reducir los efectos inespecíficos y aumentar la eficacia de los linfocitos T. Los linfocitos T que carecen de manera estable de la expresión de un TCR funcional pueden producirse usando una variedad de
15 enfoques. Los linfocitos T internalizan, separan y degradan todo el receptor de linfocitos T como un complejo, con una semivida de aproximadamente 10 horas en linfocitos T en reposo y 3 horas en linfocitos T estimulados (von Essen, M. *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:384-393). El funcionamiento adecuado
20 del complejo TCR requiere la relación estequiométrica adecuada de las proteínas que componen el complejo TCR. La función del TCR también requiere dos proteínas zeta de TCR funcionales con motivos ITAM. La activación del TCR tras la interacción de su ligando peptídico MHC requiere la interacción de varios TCR en
25 el mismo linfocito T, que todos los cuales deben señalar adecuadamente. Por lo tanto, si un complejo TCR se desestabiliza con proteínas que no se asocian adecuadamente o no pueden señalar de manera óptima, el linfocito T no se activará de manera suficiente para comenzar una respuesta
30 celular.

En consecuencia, en algunas realizaciones, la expresión de TCR puede eliminarse mediante la interferencia por ARN (por ejemplo, ARNhc, ARNip, miARN, etc.), CRISPR u otros métodos que se dirigen a los ácidos nucleicos que codifican TCR
5 específicos (por ejemplo, TCR- α y TCR- β) y/o cadenas de CD3 en linfocitos T primarios. Al bloquear la expresión de una o más de estas proteínas, el linfocito T ya no producirá uno o más de los componentes clave del complejo TCR, desestabilizando así el complejo TCR y evitando la expresión en la superficie
10 celular de un TCR funcional. Aunque algunos complejos TCR pueden reciclarse a la superficie celular cuando se usa la interferencia por ARN, el ARN (por ejemplo, ARNhc, ARNip, miARN, etc.) evitará una nueva producción de proteínas TCR que da como resultado la degradación y eliminación de todo el
15 complejo TCR, dando como resultado la producción de un linfocito T que tiene una deficiencia estable en la expresión de TCR funcional.

La expresión de ARN inhibidores (por ejemplo, ARNhc,
20 ARNip, miARN, etc.) en linfocitos T primarios se puede lograr usando cualquier sistema de expresión convencional, por ejemplo, un sistema de expresión lentivírico. Aunque los lentivirus son útiles para dirigirse a los linfocitos T primarios en reposo, no todos los linfocitos T expresarán los
25 ARNhc. Algunas de estos linfocitos T pueden no expresar cantidades suficientes de ARN para permitir una inhibición suficiente de la expresión de TCR para alterar la actividad funcional del linfocito T. Por lo tanto, los linfocitos T que conservan una expresión de TCR de moderada a alta después de
30 la transducción vírica pueden eliminarse, por ejemplo, mediante técnicas de clasificación o separación de células, de modo que

los linfocitos T restantes sean deficientes en CD3 o TCR de la superficie celular, permitiendo la expansión de una población aislada de linfocitos T deficientes en la expresión de CD3 o TCR funcional.

5

La expresión de CRISPR en linfocitos T primarios se puede lograr utilizando sistemas CRISPR/Cas convencionales y ARN guía específicos para los TCR diana. Se conocen en la materia sistemas de expresión adecuados, por ejemplo, sistemas de expresión lentivíricos o adenovíricos. De manera similar a la inserción de ARN inhibidores, el sistema CRISPR puede usarse para dirigirse específicamente a linfocitos T primarios en reposo u otras células inmunitarias adecuadas para la terapia con células con CAR. Además, en la medida en que la edición de CRISPR no sea satisfactoria, las células pueden seleccionarse para que tengan éxito de acuerdo con los métodos divulgados anteriormente. Por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, los linfocitos T que conservan una expresión de TCR de moderada a alta después de la transducción vírica pueden eliminarse, por ejemplo, mediante técnicas de clasificación o separación de células, de modo que los linfocitos T restantes sean deficientes en CD3 o TCR de la superficie celular, permitiendo la expansión de una población aislada de linfocitos T deficientes en la expresión de CD3 o TCR funcional. Se aprecia además que una construcción de edición de CRISPR puede ser útil tanto para la inactivación del TCR endógeno como para la inserción de las construcciones CAR divulgadas en el presente documento. En consecuencia, se aprecia que se puede diseñar un sistema CRISPR para lograr uno o ambos de estos propósitos.

30

Fuentes de células aisladas. Antes de la expansión y

modificación genética de las células divulgadas en el presente documento, se pueden obtener células de un sujeto, por ejemplo, en realizaciones que implican terapia autóloga, o de un cultivo celular disponible comercialmente, por ejemplo, American Type
5 Culture Collection (ATCC).

Las células se pueden obtener de varias fuentes en un sujeto, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón
10 umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores.

Los métodos para aislar células apropiadas son bien conocidos en la materia y pueden adaptarse fácilmente a la
15 presente solicitud; un método ilustrativo se describe en los ejemplos siguientes. Los métodos de aislamiento para usar en relación con la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, el sistema Life Technologies Dynabeads®; los kits de separación celular STEMcell Technologies EasySep™,
20 RoboSep™, RosetteSep™, SepMate™; Miltenyi Biotec MACS™ y otros kits de separación y aislamiento celular disponibles comercialmente. Pueden aislarse subpoblaciones particulares de células inmunitarias mediante el uso de perlas u otros agentes de unión disponibles en dichos kits específicos para marcadores
25 de superficie celular únicos. Por ejemplo, se pueden usar microperlas para CD4+ y CD8+ de MACS™ para aislar linfocitos T CD4+ y CD8+.

Alternativamente, se pueden obtener células a través de
30 cultivos celulares disponibles comercialmente, incluyendo, pero sin limitación, para linfocitos T, las líneas BCL2 (AAA)

Jurkat (ATCC® CRL-2902™), BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™), BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™), BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™), Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™); para linfocitos B, las líneas AHH-1 (ATCC® CRL-8146™), BC-1 (ATCC® CRL-2230™), BC-2 (ATCC® CRL-2231™), BC-3 (ATCC® CRL-2277™), CA46 (ATCC® CRL-1648™), DG-75 [D.G.-75] (ATCC® CRL-2625™), DS-1 (ATCC® CRL-11102™), EB-3 [EB3] (ATCC® CCL-85™), Z-138 (ATCC n.º CRL-3001), DB (ATCC CRL-2289), Toledo (ATCC CRL-2631), Pfiffer (ATCC CRL-2632), SR (ATCC CRL-2262), JM-1 (ATCC CRL-10421), NFS-5 C-1 (ATCC CRL-1693); NFS-70 C10 (ATCC CRL-1694), NFS-25 C-3 (ATCC CRL-1695), y SUP-B15 (ATCC CRL-1929); y, para células NK, las líneas NK-92 (ATCC® CRL-2407™), NK-92MI (ATCC® CRL-2408™). Otros ejemplos incluyen, pero sin limitación, líneas de linfocitos T maduros, por ejemplo, Deglis, EBT-8, HPB-MLp-W, HUT 78, HUT 102, Karpas 384, Ki 225, My-La, Se-Ax, SKW-3, SMZ-1 y T34; líneas de linfocitos T inmaduros, por ejemplo, ALL-SIL, Be13, CCRF-CEM, CML-T1, DND-41, DU.528, EU-9, HD-Mar, HPB-ALL, H-SB2, HT-1, JK-T1, Jurkat, Karpas 45, KE-37, KOPT-K1, K-T1, L-KAW, Loucy, MAT, MOLT-1, MOLT 3, MOLT-4, MOLT 13, MOLT-16, MT-1, MT-ALL, P12/Ichikawa, Peer, PER0117, PER-255, PF-382, PFI-285, RPMI-8402, ST-4, SUP-T1 a T14, TALL-1, TALL-101, TALL-103/2, TALL-104, TALL-105, TALL-106, TALL-107, TALL-197, TK-6, TLBR-1, -2, -3 y -4, CCRF-HSB-2 (CCL-120.1), J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153), J45.01 (ATCC CRL-1990), J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063), RS4;11 (ATCC CRL-1873), CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119); líneas de linfoma cutáneo de linfocitos T, por ejemplo, HuT78 (ATCC CRM-TIB-161), MJ[G11] (ATCC CRL-8294), HuT102 (ATCC TIB-162); líneas de linfocitos B procedentes de linfomas anaplásicos y de células grandes, por ejemplo, DEL, DL-40, FE-PD, JB6, Karpas 299, Ki-JK, Mac-2A Ply1, SR-786, SU-DHL-1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, y -16, DOHH-2, NU-DHL-1, U-937, Granda 519, USC-

DHL-1, RL; linfomas de Hodgkin, por ejemplo, DEV, HD-70, HDLM-2, HD-MyZ, HKB-1, KM-H2, L 428, L 540, L1236, SBH-1, SUP-HD1 y SU/RH-HD-1; y líneas NK tales como HANK1, KHYG-1, NKL, NK-YS, NOI-90 e YT. Las líneas celulares de leucemia nula, incluyendo, pero sin limitación, REH, NALL-1, KM-3, L92-221, son otra fuente comercialmente disponible de células inmunitarias, al igual que las líneas celulares procedentes de otras leucemias y linfomas, tales como K562 de eritroleucemia, THP-1 de leucemia monocítica, U937 de linfoma, HEL de eritroleucemia, HL60 de leucemia, HMC-1 de leucemia, KG-1 de leucemia, U266 de mieloma. Las fuentes ilustrativas no limitantes para dichas líneas celulares disponibles comercialmente incluyen la American Type Culture Collection, o ATCC, (<http://www.atcc.org/>) y la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>).

Vectores. Las células con CAR se pueden preparar usando vectores que comprenden los polinucleótidos como se describió anteriormente. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona: (i) un vector, opcionalmente un vector bicistrónico, que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de ácido nucleico de un CAR de FLT3 o un complemento o equivalente del mismo y, opcionalmente, que comprende además una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de ácido nucleico de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que opcionalmente reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 o un equivalente de cada uno de los mismos o (ii) un vector que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de ácido nucleico de un CAR de FLT3 o un complemento o equivalente del mismo y un vector que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la

secuencia de ácido nucleico de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que opcionalmente reconoce y se une PD-1 y/o PD-L1 o un equivalente de cada uno de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un antagonista o agonista de PD-1 y/o un antagonista o agonista de PD-L1 o un equivalente de cada uno de los mismos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o incluso consiste además en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o incluso consiste además en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o incluso consiste además en, un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y/o un equivalente de cada uno de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de

unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1, que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por:

scFv anti-PD-1:

```

CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTTT
5 CTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTCC
AGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAAC
GAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAAGTCAAGTACGACTACAGCATAACATGG
AACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATCG
CTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGT
10 GGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCC
CAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGA
TGTGTCAACCGCTGTGCGCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCATC
TACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGA
CGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCCA
15 ACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG, o
un equivalente de la misma.

```

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa
20 consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, un fragmento variable de cadena única (scFv) procedente de un anticuerpo contra PD-L1 que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia
25 polinucleotídica: scFv anti-PD-L1:

```

GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTGT
CCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCCC
GGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCACCTACTATGCT
GATTCAGTAAAAGGACGGTTCATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTTC
30 AAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGCC
AGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGC

```

AGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCA
 CATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCAG
 TACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTT
 CTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGT
 5 CTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTA
 TTGCCAACATTACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA
 , o un equivalente de la misma.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de
 10 unión a antígeno del mismo es un anticuerpo biespecífico. En
 algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o
 de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso
 consiste además en, un antagonista o agonista de PD-1 y/o un
 antagonista o agonista de PD-L1. En determinadas realizaciones,
 15 el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa
 consiste esencialmente en el mismo, o incluso consiste además
 en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo que
 reconoce y se une a PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un
 equivalente de cada una de las mismas. En algunas
 20 realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma
 alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además
 consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena
 ligera de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1, y/o un
 equivalente de cada una de las mismas. En algunas
 25 realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma
 alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste
 además en, un fragmento variable de cadena única (scFv) que
 comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de
 PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que
 30 comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de
 PD-L1 y/o un equivalente de cada uno de los mismos. En algunas

realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 comprende la secuencia de aminoácidos de scFv anti-PD-1 proporcionada anteriormente en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, un fragmento variable de cadena única (scFv) procedente de un anticuerpo contra PD-L1 que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, la secuencia de aminoácidos de scFv anti-PD-L1 proporcionada anteriormente en el presente documento.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el vector o vectores pueden opcionalmente comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o consistir además en un marcador detectable y/o un polinucleótido que confiere resistencia a antibióticos y/o elementos reguladores para la transcripción y traducción del CAR y el dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, cada uno de los polinucleótidos puede estar operativamente unido a un polinucleótido regulador, opcionalmente un promotor y/o potenciador. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 está operativamente unido a un promotor y/o potenciador que permite una sobreexpresión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico aislada del CAR de FLT3 codifica para un CAR que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3, un dominio de bisagra, un dominio transmembrana CD28, una o más regiones coestimuladoras seleccionadas de una región de señalización coestimuladora CD28, una región de señalización coestimuladora 4-1BB, una región de señalización coestimuladora ICOS, y una región coestimuladora OX40, y un dominio de señalización CD3 zeta. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno tiene una afinidad de unión a FLT3 que es al menos aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 veces mayor que su afinidad de unión por una molécula no relacionada con el FLT3. En realizaciones específicas, la secuencia de ácido nucleico aislada comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en la misma, o incluso consiste además en, secuencias que codifican (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3 seguido de (b) un dominio de bisagra, (c) un dominio transmembrana CD28 seguido de (d) una o más regiones coestimuladoras seleccionadas de una región de señalización coestimuladora CD28, una región de señalización coestimuladora 4-1BB, una región de señalización coestimuladora ICOS, y una región coestimuladora OX40 seguida de (e) un dominio de señalización CD3 zeta.

25

En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico aislada además comprende, o además consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, una secuencia promotora de polinucleótidos ubicada cadena arriba del polinucleótido que codifica el dominio de unión a antígeno del dominio de unión al antígeno FLT3 del anticuerpo de FLT3. En

30

algunas realizaciones, este promotor es una secuencia promotora de citomegalovirus (CMV), un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo (MND), o un promotor EF1 alfa. Se proporcionan en el presente documento secuencias ilustrativas no limitantes de dichos promotores.

Secuencia promotora de CMV:

TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAAC
 TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAAT
 10 GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT
 TTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA
 TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGA
 CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTT
 TGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACC
 15 CCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTG
 TAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATA
 AGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAG, y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

20 Secuencia promotora de CMV:

GCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTTTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAAC
 CGTCAGATC, y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Secuencia promotora de MND:

25 Aactaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctctata
 taagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgccctggagacgccatccacgctgttttga
 cctccatagaagacaccgactctagaggatc, y, opcionalmente, un
 equivalente de la misma.

30 Secuencia del promotor EF1 alfa:

AAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCC

GAGAAGTTGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACGGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAA
 ACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTA
 TATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG
 CTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCC
 5 ATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTC
 CGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGG
 AGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACG
 TCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTAC,

y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

10

En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico aislada además comprende, o además consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, una caspasa inducible ("iCasp") u otro "gen suicida" que codifica la
 15 secuencia polinucleotídica ubicada cadena arriba del polinucleótido que codifica el dominio de unión a antígeno del dominio de unión al antígeno FLT3 del anticuerpo de FLT3; se proporciona en el presente documento una secuencia polinucleotídica ilustrativa no limitante de dicho gen iCasp:

20 Secuencia de iCasp:

ATGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCC
 AGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCTCCCG
 GGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAA
 GAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATG
 25 CCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGT
 GGAGCTTCTAAAACTGGAATCTGGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT
 GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTG
 GCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCAC
 TGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTG
 30 GAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGC
 AGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAG

CCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTGGTTCGAGAAG
ATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTT
TCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCC
TGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTG
5 AGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGT
CCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGT
TGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTG
CTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATA, y, opcionalmente, un
equivalente de la misma.

10

En algunas realizaciones, la construcción del gen iCasp
comprende una porción de una caspasa 9 unida operativamente a
un dominio de proteína FKBP. La caspasa 9, codificada por el
gen CASP9 (número de acceso GenBank NM001229), es un ejemplo
15 no limitante de una caspasa iniciadora y juega un papel en la
vía apoptótica mitocondrial; una parte de la misma está
presente en la secuencia ilustrativa no limitante divulgada
anteriormente. El dominio de proteína FKBP en la secuencia
ilustrativa no limitante divulgada anteriormente está
20 optimizado para unirse a un agente inductor, específicamente
un inductor químico de dimerización (CID, por sus siglas en
inglés). En la secuencia divulgada anteriormente, el inductor
químico es AP1903, un fármaco sintético que ha demostrado ser
seguro en voluntarios sanos. Se prevé que equivalentes tanto
25 del dominio FKBP como del inductor químico de dimerización (por
ejemplo, formas modificadas de AP1903 o FKBP) puedan usarse en
lugar de las realizaciones ilustrativas enumeradas. En algún
aspecto, la dimerización se puede inducir mediante cualquier
molécula pequeña conocida para facilitar la dimerización de la
30 caspasa 9. La administración de esta pequeña molécula da como
resultado el entrecruzamiento y la activación de la caspasa 9,

que a su vez induce la apoptosis de células que expresan el gen iCasp.

Secuencia de aminoácidos de iCasp:

5 MG VQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTG MLEDGKKVDSSRD RNKPFK FMLGKQEVIRGWE
EGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGGSGVDGFGDVG
ALES LRGNADLAYILSMEPCGHCLIINN VNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMV
EVKGD LTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSV EK
IVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKD HGF EVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGL
10 RTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFP GFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSL L
LRVANAVSVKGIY, y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico aislada además comprende, o además consiste
15 esencialmente en, o incluso consiste además en, una secuencia polinucleotídica que codifica el péptido 2A (T2A) ubicada
cadena arriba del polinucleótido que codifica el dominio de unión a antígeno del dominio de unión al antígeno FLT3 del anticuerpo de FLT3; se proporciona en el presente documento
20 una secuencia que codifica un ejemplo no limitante de dicho polinucleótido T2A:

Secuencia de T2A:

GCCGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCT, y,
opcionalmente, un equivalente de la misma.

25

Secuencia de aminoácidos de T2A:

AEGRGSLLTCGDVEENPGP, y opcionalmente un equivalente de la misma.

30 En realizaciones que implican T2A, la "autoescisión" mediada por T2A puede dar lugar a una relación 1:1 de las dos

proteínas separadas.

En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico aislada además comprende, o además consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, un péptido señal que codifica la secuencia polinucleotídica ubicada arriba del polinucleótido que codifica el dominio de unión a antígeno del dominio de unión al antígeno FLT3 del anticuerpo de FLT3; se proporcionan en el presente documento polinucleótidos que codifican secuencias ilustrativas no limitantes de dichos péptidos señal.

Secuencia de péptido señal que codifica la secuencia polinucleotídica:

15 ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC, y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Secuencia de aminoácidos del péptido señal:

MGWSSIILFLVATATGVH, y opcionalmente un equivalente de la misma.

20

Secuencia de péptido señal:

MGWSCIILFLVATATGVHS, y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

25 Secuencia de péptido señal:

MDWIWRILFLVGAATGAHS, y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado comprende un marcador detectable y/o un polinucleótido que confiere resistencia a antibióticos. En un aspecto, el marcador

30

o polinucleótido son útiles para seleccionar células transducidas con éxito con los ácidos nucleicos aislados. En determinadas realizaciones, este marcador detectable es un marcador de proteína procedente del gen c-myc conocido como "marcador myc". Una secuencia ilustrativa no limitante que codifica dicho marcador myc se divulga a continuación.

Secuencia "myc":

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG, y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

Secuencia de aminoácidos "myc":

EQKLISEEDL, y, opcionalmente, un equivalente de la misma.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico aislado está comprendida dentro de un vector. En determinadas realizaciones, el vector es un plásmido. En otras realizaciones, el vector es un vector vírico. Ejemplos no limitantes de los mismos incluyen, sin limitación, un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector adenovírico y un vector vírico adenoasociado. En realizaciones específicas, el vector es un vector lentivírico.

La preparación de vectores ilustrativos y la generación de células que expresan CAR usando dichos vectores se explica en detalle en los ejemplos siguientes. En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican CAR o moléculas inmunorreguladoras se logra normalmente mediante la unión operativa de un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o porciones del mismo a un promotor y mediante la incorporación de la construcción en un vector de expresión.

Puede usarse un método similar para construir la secuencia de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica una molécula inmunorreguladora. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación e integración en eucariotas.

5 Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

10

En un aspecto, el término "vector" se refiere a un vector recombinante que conserva la capacidad de infectar y transducir células que no se dividen y/o que se dividen lentamente y se integra en el genoma de la célula diana. En varios aspectos, el vector procede o se basa en un virus de tipo silvestre. En 15 aspectos adicionales, el vector procede o se basa en un lentivirus de tipo silvestre. Ejemplos de dichos incluyen, sin limitación, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la anemia infecciosa equina (EIAV, por sus siglas en inglés), virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV, por 20 sus siglas en inglés) y virus de la inmunodeficiencia felina (FIV, por sus siglas en inglés). Alternativamente, se contempla que se pueden usar otros retrovirus como base para la cadena principal de un vector tal como el virus de la leucemia murina 25 (MLV, por sus siglas en inglés). Será evidente que un vector vírico de acuerdo con la divulgación no necesita estar limitado a los componentes de un virus particular. El vector vírico puede comprender componentes procedentes de dos o más virus diferentes y también puede comprender componentes sintéticos. 30 Los componentes del vector se pueden manipular para obtener las características deseadas; tales como especificidad de la

célula diana.

Los vectores recombinantes de la presente divulgación proceden de primates y no primates. Ejemplos de lentivirus de primates incluyen el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA) y el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV). El grupo de lentivirus de no primates incluye el prototipo de "virus lento", el virus visna/maedi (VMV, por sus siglas en inglés), así como el virus de la encefalitis-artritis caprina (CAEV, por sus siglas en inglés) relacionado, el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV, por sus siglas en inglés) y el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV, por sus siglas en inglés) descritos más recientemente. Los vectores lentivíricos recombinantes de la técnica anterior son conocidos en la materia, por ejemplo, véanse las patentes de Estados Unidos números 6,924,123; 7.056.699; 7.419.829 y 7.442.551, incorporadas por referencia en el presente documento.

20

La patente de Estados Unidos N.º 6.924.123 divulga que determinada secuencia retrovímica facilita la integración en el genoma de la célula diana. Esta patente enseña que cada genoma retrovímico comprende genes llamados gag, pol y env que codifican proteínas y enzimas viriónicas. Estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones llamadas repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés). Las LTR son responsables de la integración provímica y la transcripción. También sirven como secuencias potenciadoras-promotoras. En otras palabras, las LTR pueden controlar la expresión de los genes víricos. La encapsidación de los ARN

retrovíricos se produce en virtud de una secuencia psi ubicada en el extremo 5' del genoma vírico. Las LTR en sí mismas son secuencias idénticas que se pueden dividir en tres elementos, que se llaman U3, R y U5. U3 procede de la secuencia única del extremo 3' del ARN. R procede de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN y U5 procede de la secuencia única del extremo 5' del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre diferentes retrovirus. Para el genoma vírico, el sitio de la adición de poli(A) (terminación) está en el límite entre R y U5 en el lado derecho de la LTR. U3 contiene la mayoría de los elementos de control transcripcional del provirus, que incluyen el promotor y múltiples secuencias potenciadoras sensibles a las células y, en algunos casos, proteínas activadoras de la transcripción vírica.

Con respecto a los genes estructurales gag, pol y env, gag codifica la proteína estructural interna del virus. La proteína gag se procesa proteolíticamente en las proteínas maduras MA (matriz), CA (cápside) y NC (nucleocápside). El gen pol codifica la transcriptasa inversa (RT, por sus siglas en inglés), que contiene ADN polimerasa, RNasa H asociada e integrasa (IN), que median la replicación del genoma.

Para la producción de partículas de vectores víricos, el genoma de ARN del vector se expresa a partir de una construcción de ADN que lo codifica, en una célula hospedadora. Los componentes de las partículas no codificadas por el genoma del vector se proporcionan en trans mediante secuencias de ácido nucleico adicionales (el "sistema de empaquetamiento", que normalmente incluye uno o ambos genes gag/pol y env) expresados

en la célula hospedadora. El conjunto de secuencias necesarias para la producción de las partículas del vector vírico puede introducirse en la célula hospedadora mediante transfección transitoria, o puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora, o puede proporcionarse en una mezcla de varias formas. Las técnicas implicadas se conocen por parte de los expertos en la materia.

Los vectores retrovíricos para usar en la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, las versiones 4, 6 y 6.2 del sistema "ViraPower" de la serie pLenti de Invitrogen. Fabricado por Lentigen Corp.; pHIV-7-GFP, laboratorio generado y utilizado por el City of Hope Research Institute; vector lentivírico "Lenti-X", pLVX, fabricado por Clontech; pLK0.1-puro, fabricado por Sigma-Aldrich; pLemiR, fabricado por Open Biosystems; y pLV, laboratorio generado y utilizado por Charité Medical School, Institute of Virology (CBF), Berlín, Alemania.

Se conocen en la materia métodos adicionales de introducción de ácidos nucleicos exógenos e incluyen, pero sin limitación, la inserción de genes usando uno o más de electroporación de ARN, nanotecnología, vectores de Bella durmiente, retrovirus y/o adenovirus. Además,

independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedadora o de otra manera exponer una célula al inhibidor de la presente divulgación, para confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula hospedadora, se pueden realizar distintos ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la materia, tales como transferencia de Southern y

Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detección de la presencia o ausencia de un péptido en particular, por ejemplo, mediante medios inmunológicos (ELISA y transferencias Western) o mediante ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que caen dentro del alcance de la divulgación.

Vector de empaquetamiento y líneas celulares. Los ácidos nucleicos aislados se pueden empaquetar en un sistema de empaquetamiento retrovílico usando un vector de empaquetamiento y líneas celulares. El vector de empaquetamiento incluye, pero sin limitación, un vector retrovílico, vector lentivílico, vector adenovílico y vector vírico adenoasociado. El vector de empaquetamiento contiene elementos y secuencias que facilitan la inserción de materiales genéticos en las células. Por ejemplo, las construcciones retrovíricas son vectores de empaquetamiento que comprenden al menos una secuencia de ADN auxiliar retrovílico procedente de un genoma retrovílico incompetente para la replicación que codifica en trans todas las proteínas de virión necesarias para empaquetar un vector retrovílico incompetente para la replicación, y para producir proteínas de virión capaces de empaquetar el vector retrovílico incompetente para la replicación a título alto, sin la producción de virus auxiliares competentes para la replicación. La secuencia de ADN retrovílico carece de la región que codifica el potenciador y/o promotor natural de la LTR vírica en 5' del virus, y carece tanto de la secuencia de función psi responsable del empaquetamiento del genoma auxiliar como de la LTR en 3', pero codifica un sitio de poliadenilación extraño, por ejemplo, el sitio de poliadenilación de SV40, y un potenciador y/o promotor

extraño que dirige la transcripción eficaz en un tipo de célula donde se desea la producción vírica. El retrovirus es un virus de leucemia tal como el virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV, por sus siglas en inglés), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la leucemia del mono de Gibon (GALV, por sus siglas en inglés). El potenciador y promotor extraño puede ser el potenciador y promotor temprano inmediato (IE, por sus siglas en inglés) del citomegalovirus humano (HCMV, por sus siglas en inglés), el potenciador y promotor (región U3) del virus del sarcoma murino de Moloney (MMSV, por sus siglas en inglés), la región U3 del virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés), la región U3 del virus formador de focos del bazo (SFFV, por sus siglas en inglés), o el potenciador IE de CMVH unido al promotor natural del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). El vector de empaquetamiento retrovílico puede consistir en dos secuencias de ADN auxiliares retrovíricas codificadas por vectores de expresión basados en plásmidos, por ejemplo, cuando una primera secuencia auxiliar contiene un ADNc que codifica las proteínas gag y pol de MMLV o GALV ecotrópicos y una segunda secuencia auxiliar contiene un ADNc que codifica la proteína env. El gen Env, que determina el intervalo de hospedadores, puede proceder de los genes que codifican proteínas env del virus de la leucemia murina 10A1 xenotrópico, anfotrópico, ecotrópico, politrópico (que forma focos de visón), o la proteína env del virus de la leucemia del mono Gibbon (GALV), la proteína env (gp160) del virus de inmunodeficiencia humana, la proteína G del virus del estomatito vesicular (VSV), los productos del gen env de la leucemia de linfocitos T humanos (HTLV) de tipo I y II, el gen de envoltura quimérico procedente de combinaciones de uno o más de los genes env mencionados

anteriormente o los genes de envoltura quiméricos que codifican el citoplasma y transmembrana de los productos génicos env
mencionados anteriormente y un anticuerpo monoclonal dirigido
contra una molécula de superficie específica en una célula
5 diana deseada.

En el proceso de empaquetamiento, los vectores de
empaquetamiento y los vectores retrovíricos se transfectan
conjuntamente de manera transitoria en una primera población
10 de células de mamíferos que son capaces de producir virus,
tales como células renales embrionarias humanas, por ejemplo,
células 293 (ATCC N.º CRL1573, ATCC, Rockville, Md.) para
producir sobrenadantes que contienen retrovirus recombinantes
de título alto. En otro método de la divulgación, esta primera
15 población de células transfectadas de manera transitoria se
cultiva, a continuación, conjuntamente con células diana de
mamíferos, por ejemplo, linfocitos humanos, para transducir
las células diana con el gen extraño con alta eficacia. En otro
método más de la divulgación, los sobrenadantes de la primera
20 población de células transfectadas de manera transitoria
descrita anteriormente se incuban con células diana de
mamífero, por ejemplo, linfocitos humanos o células madre
hematopoyéticas, para transducir las células diana con el gen
extraño con alta eficacia.

25

En otro aspecto, los vectores de empaquetamiento se
expresan de manera estable en una primera población de células
de mamífero que son capaces de producir virus, tales como
células renales embrionarias humanas, por ejemplo, células 293.
30 Los vectores retrovíricos o lentivíricos se introducen en las
células mediante transfección conjunta con un marcador

seleccionable o infección con virus pseudotipados. En ambos casos, los vectores se integran. Alternativamente, los vectores se pueden introducir en un plásmido mantenido episómicamente. Se producen sobrenadantes que contienen retrovirus recombina-
5 recombina- ntes de título alto.

En una realización específica, en el presente documento, se proporciona un polinucleótido aislado o un vector que comprende los elementos como se establece en la **FIG. 1** y
10 equivalentes de cada uno de los elementos divulgados. La **FIG. 1** divulga un CAR de FLT3 bicistrónico con anticuerpo biespecífico de PD-1-PD-L1 secretor. CAR de FLT3 está impulsado por el promotor $EF1\alpha$. El biAb de PD-1-PD-L1 está unido con CAR por T2A y dirigido por un péptido señal secretor (SS). El
15 polinucleótido aislado se puede insertar en un vector tal como un vector lentivírico que está flanqueado por repeticiones terminales largas.

Células con CAR específicas de FLT3

20

Aspectos de la presente divulgación se refieren a una célula aislada que comprende los polinucleótidos aislados y/o vectores como se describe en el presente documento en donde la célula ha expresado el polinucleótido. En un aspecto, un CAR
25 de FLT3 se prepara mediante la expresión de los polinucleótidos aislados como se divulga en el presente documento en una célula hospedadora que también expresa o comprende una región de unión a antígeno específica de PD-1 y/o PD-L1. La célula es una célula procariota o eucariota. En determinadas realizaciones,
30 la célula aislada es un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T animal, un linfocito T de mamífero, un linfocito T felino,

un linfocito T canino o un linfocito T humano. En determinadas realizaciones, la célula aislada es una célula NK, por ejemplo, una célula NK animal, una célula NK de mamífero, una célula NK felina, una célula NK canina o una célula NK humana. La célula eucariota puede ser de cualquier especie preferida, por ejemplo, una célula animal, una célula de mamífero tal como un ser humano, una célula felina o canina. En otras realizaciones, la célula eucariota es una célula inmunitaria, opcionalmente un linfocito T, un linfocito B, una célula NK, una célula dendrítica, una célula mieloide, un monocito o un macrófago. Las células son útiles desde el punto de vista terapéutico y diagnóstico. En un aspecto, la célula aislada de la presente divulgación expresa el CAR y secreta un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo biespecífico.

En realizaciones específicas, la célula aislada comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en un CAR exógeno que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; un dominio de bisagra; un dominio transmembrana, por ejemplo, un dominio transmembrana CD28; y, opcionalmente, una o más regiones coestimuladoras, por ejemplo, seleccionada de una región de señalización coestimuladora CD28, una región de señalización coestimuladora 4-1BB, una región de señalización coestimuladora ICOS y una región coestimuladora OX40; y un dominio de señalización CD3 zeta y un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1. En un aspecto adicional, las células se han activado como se describe a continuación.

En el presente documento se proporcionan además poblaciones de células aisladas de la presente divulgación. También se proporciona una población de células que se activan y expanden a partir de una célula descrita anteriormente. La población puede ser sustancialmente homogénea, que tenga células que sean al menos un 50 %, o alternativamente al menos un 60 %, o alternativamente al menos un 70 %, o alternativamente al menos un 75 %, o alternativamente al menos un 80 %, o alternativamente al menos un 85 %, o alternativamente al menos un 90 %, o alternativamente al menos un 95 %, o alternativamente al menos un 98 %, idénticas.

Activación y expansión de células con CAR. Ya sea antes o después de la modificación genética de las células para expresar un CAR deseable, las células se pueden activar y expandir usando métodos generalmente conocidos tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos números 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 bibliografía tal como Lapateva *et al.* (2014) Crit Rev Oncog 19(1-2):121-132; Tam *et al.* (2003) Cytotherapy 5(3):259-272; Garcia-Marquez *et al.* (2014) Cytotherapy 16(11):1537-1544. La estimulación con el antígeno FLT3, PD-1 o PD-L1 *ex vivo* puede activar y expandir la subpoblación de células seleccionada que expresa CAR. Alternativamente, las células pueden activarse *in vivo* mediante interacción con el antígeno FLT3, PD-1 o PD-L1.

En el caso de determinadas células inmunitarias, pueden ser necesarias poblaciones de células adicionales, ligandos solubles y/o citocinas, o agentes estimulantes para activar y

expandir las células. Los reactivos apropiados son bien conocidos en la materia y se seleccionan de acuerdo con principios inmunológicos conocidos. Por ejemplo, el ligando CD-40 soluble puede ser útil para activar y expandir determinadas poblaciones de linfocitos B; de forma similar, pueden usarse células alimentadoras irradiadas en el procedimiento para la activación y expansión de células NK.

Los métodos para activar células apropiadas son bien conocidos en la materia y se pueden adaptar fácilmente a la presente solicitud; un método ilustrativo se describe en los ejemplos siguientes. Los métodos de aislamiento para usar en relación con la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, kits de expansión y activación del sistema Life Technologies Dynabeads®; kits de activación de BD Biosciences Phosflow™, kits de activación/expansión Miltenyi Biotec MACS™ y otros kits de células disponibles comercialmente específicos para los restos de activación de la célula en cuestión. Se pueden activar o expandir subpoblaciones particulares de células inmunitarias mediante el uso de perlas u otros agentes disponibles en dichos kits. Por ejemplo, las α -CD3/ α -CD28 Dynabeads® se pueden usar para activar y expandir una población de linfocitos T aislados.

En el presente documento se describe además un complejo aislado que comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en la célula aislada de la presente divulgación unida a una célula que expresa FLT3 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o un fragmento de la misma. En otro aspecto, el complejo aislado comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste

además en la célula aislada de la presente divulgación unida a FLT3 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o un fragmento de los mismos.

Composiciones y transportadores

5

Los aspectos adicionales de la divulgación se refieren a composiciones que comprenden, o que de forma alternativa consisten esencialmente en, o que incluso consisten además en, un transportador y uno o más de los productos, por ejemplo, un
10 CAR de FLT3, una célula aislada que comprende un CAR de FLT3 y una región de unión al antígeno PD-1 y/o PD-L1, una población de células, un ácido nucleico aislado, un vector, una célula aislada que contiene el polinucleótido que codifica el CAR de FLT3 y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo,
15 opcionalmente, un anticuerpo biespecífico. El transportador puede ser un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, en el presente documento se proporciona una composición que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en el ácido
20 nucleico aislado o vector, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno, el polipéptido, la célula aislada y/o la población de células divulgadas en el presente documento, y, opcionalmente, un transportador farmacéuticamente aceptable.

25 En aspectos adicionales, la composición puede comprender adicionalmente una molécula inmunorreguladora y/o un ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que reconoce y se une opcionalmente a PD-1 y/o PD-L1. En
30 determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste

esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada una de las mismas y/o dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y/o uno equivalente de cada uno de los mismos. En algunas realizaciones, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia polinucleotídica:

25 scFv anti-PD-1:

CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTTT
 CTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTCC
 AGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAAC
 GAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAAGTCAAGTACGACTACAGCATAACATGG
 30 AACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATCG
 CTTGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGT

GGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCC
 CAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGA
 TGTGTCAACCGCTGTGCGCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCATC
 TACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGA
 5 CGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGACGCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCCA
 ACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG, o
 un equivalente de la misma.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de
 10 unión a antígeno del mismo comprende un fragmento variable de
 cadena única (scFv) procedente de un anticuerpo contra PD-L1
 que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la
 secuencia polinucleotídica:

scFv anti-PD-L1:

15 GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTGT
 CCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCCC
 GGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCACCTACTATGCT
 GATTGAGTAAAAGGACGGTTCATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTTC
 AAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGCC
 20 AGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGC
 AGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCA
 CATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAGGTGTCAG
 TACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTT
 CTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGT
 25 CTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTA
 TTGCCAACATTACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA
 , o un equivalente de la misma.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de
 30 unión a antígeno del mismo es un anticuerpo biespecífico. En
 determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico

comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada una de las mismas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y/o uno equivalente de cada uno de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición comprende un inhibidor de FLT3. Sin quedar unidos a la teoría, se cree que dicho inhibidor puede aumentar la expresión en la superficie de FLT3 en las células diana. Ejemplos no limitantes de inhibidores de FLT3 incluyen gilteritinib (Astellas), quizaritinib (Ambit Biosciences), midostaurin (Novartis), sorafenib (Bayer y Onxy Pharmaceuticals), sunitinib (Pfizer), lestaurutinib (Cephalon), FF-10101 (Fuijfilm), y dovitinib (Novartis u Oncology Venture).

Resumiendo, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que incluyen, pero sin limitación, una cualquiera de las composiciones reivindicadas se describe en el presente documento, en combinación con uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; hidratos de carbono tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse para administración oral, intravenosa, tópica, enteral y/o parenteral. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente divulgación se formulan para administración intravenosa.

La administración de las células o composiciones puede realizarse en una dosis, de forma continua o intermitente durante el curso del tratamiento. Los métodos para determinar los medios y las dosificaciones de administración más eficaces son conocidos por los expertos en la materia, y variarán según la composición usada para la terapia, el propósito de la terapia y el sujeto a tratar. Las administraciones únicas o múltiples pueden llevarse a cabo con el nivel de dosis y el patrón a seleccionar por el médico tratante. Las formulaciones de dosificación adecuadas y los métodos de administración de los agentes se conocen en la materia. En un aspecto adicional, las células y la composición de la divulgación se pueden administrar en combinación con otros tratamientos.

Las células y poblaciones de células se administran al hospedador utilizando métodos conocidos en la materia y descritos, por ejemplo, en la solicitud internacional PCT N.º PCT/US2011/064191. Esta administración de las células o composiciones de la divulgación se puede realizar para generar un modelo animal de la enfermedad, trastorno o afección deseada para ensayos experimentales y de detección.

Métodos de uso

10

Aplicación terapéutica. Los aspectos del método de la presente divulgación se refieren a métodos para inhibir un tumor/cáncer en un sujeto que lo necesite y/o para tratar a un paciente con cáncer o un sujeto que lo necesite. En el presente documento se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento de un cáncer o tumor que expresa FLT3, opcionalmente leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto, que comprende, o que de forma alternativa consiste esencialmente en, o que incluso consiste además en poner en contacto el cáncer o tumor con la célula aislada de o la composición de la presente divulgación. En un aspecto, el método para inhibir el crecimiento de un cáncer o tumor que expresa FLT3 en un sujeto, opcionalmente leucemia mieloide aguda (AML), comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en medir la expresión de PD-1 y/o PD-L1 en el sujeto y administrar la célula aislada, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno y/o la composición de la presente divulgación a un sujeto que expresa PD-1 y/o PD-L1. En el presente documento se describen además métodos para inhibir el crecimiento de un cáncer o tumor en un sujeto, opcionalmente leucemia mieloide aguda (AML), que comprende, o que de forma alternativa consiste

esencialmente en, o que incluso consiste además en medir la expresión de PD-1 y/o PD-L1 en el sujeto y administrar el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno y/o la composición a un sujeto que expresa PD-1 y/o PD-L1. El contacto puede ser

5 *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, cuando el contacto es *in vivo*, las células aisladas son autólogas de un sujeto en tratamiento. En otras realizaciones, cuando el contacto es *in vivo*, las células aisladas son alogénicas para un sujeto en tratamiento. En algunas realizaciones, el cáncer

10 es un cáncer que afecta a la sangre y/o la médula ósea; en algunas realizaciones, el cáncer es leucemia mieloide aguda. En algunas realizaciones, la célula tumoral/cancerosa expresa o sobreexpresa FLT3 y, opcionalmente, PD-1. En determinadas realizaciones, estos métodos comprenden, o de forma alternativa

15 consisten esencialmente en, o incluso consisten además en, administrar al sujeto o paciente una cantidad eficaz de la célula aislada o composiciones divulgadas en el presente documento. En realizaciones adicionales, esta célula aislada comprende o expresa un CAR y/o un anticuerpo o fragmento de

20 unión a antígeno del mismo, que reconoce y se une opcionalmente a PD-1 y/o PD-L1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo

25 contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o

30 cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada una de las mismas. En algunas

realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y/o uno equivalente de cada uno de los mismos. En algunas realizaciones, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia polinucleotídica:

10 scFv anti-PD-1:

CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTTT
CTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTCC
AGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAAC
GAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAAGTCAAGTACGACTACAGCATAACATGG
15 AACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATCG
CTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGGT
GGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCCC
CAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAGA
TGTGTCAACCGCTGTGCGCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCATC
20 TACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGGA
CGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCCA
ACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG, o
un equivalente de la misma.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) procedente de un anticuerpo contra PD-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia polinucleotídica:

30 scFv anti-PD-L1:

GAAGTTCAGTTGGTTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTGT

CCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCCC
 GGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCACCTACTATGCT
 GATTCAGTAAAAGGACGGTTCCTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTTC
 AAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGCC
 5 AGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGGC
 AGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCCA
 CATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAGGTGTCAG
 TACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCTT
 CTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGGT
 10 CTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACTA
 TTGCCAACATTCACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAAA
 , o un equivalente de la misma.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de
 15 unión a antígeno del mismo es un anticuerpo biespecífico. En
 determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico
 comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en el
 mismo, o además consiste en las regiones CDR correspondientes
 de un anticuerpo contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o
 20 un equivalente de cada una de las mismas. En determinadas
 realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende, o de forma
 alternativa consiste esencialmente en el mismo, o además
 consiste en las regiones CDR correspondientes de un anticuerpo
 contra PD-1 y/o un anticuerpo contra PD-L1, o un equivalente
 25 de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, el
 anticuerpo biespecífico comprende, o de forma alternativa
 consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la
 región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un
 anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada
 30 una de las mismas. En algunas realizaciones, el anticuerpo
 biespecífico comprende un fragmento variable de cadena única

(scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y/o uno equivalente de cada uno de los
5 mismos.

En otras realizaciones adicionales, la célula aislada es un linfocito T o una célula NK. En algunas realizaciones, la célula aislada es autóloga o alogénica del sujeto o paciente
10 que está siendo tratado. En un aspecto adicional, el tumor/cáncer expresa FLT3 y el sujeto ha sido seleccionado para la terapia mediante un diagnóstico, tal como uno descrito en el presente documento. El sujeto es un animal, un mamífero, un canino, un felino, un bovino, un equino, un murino o un paciente
15 humano.

Las células con CAR de FLT3 como se divulgan en el presente documento pueden administrarse solas o en combinación con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo,
20 opcionalmente el anticuerpo biespecífico, desvelado en el presente documento, diluyentes, terapias antineoplásicas conocidas y/o con otros componentes tales como citocinas u otras poblaciones celulares que son inmunorreguladoras. Pueden administrarse como terapia de primera línea, terapia de segunda
25 línea, terapia de tercera línea o terapia adicional. Ejemplos no limitantes de terapias adicionales incluyen la terapia citorreductora, tal como la escisión quirúrgica, radioterapia, crioterapia, o quimioterapia, o productos biológicos, como el trasplante de células madre hematopoyéticas. En consecuencia,
30 en algunas realizaciones, los métodos para inhibir el crecimiento de un cáncer o tumor divulgados en el presente

documento pueden además comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en los mismos, o además consistir en administrar al sujeto una cantidad eficaz de una terapia citorreductora. En un aspecto, la terapia citorreductora comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en la misma, o además consiste en quimioterapia, crioterapia, hipertermia, terapia dirigida y/o radioterapia. En algunas realizaciones, las células con CAR de FLT3 pueden administrarse antes o después de una cualquiera de estas terapias ilustrativas no limitantes, por ejemplo, antes del trasplante de células madre hematopoyéticas o después de la radioterapia o la quimioterapia. En realizaciones donde se utilizan células con CAR de FLT3 antes del trasplante de células madre hematopoyéticas, las células con CAR de FLT3 pueden usarse para lograr la remisión antes del suministro de células madre hematopoyéticas; en general, el trasplante de células madre hematopoyéticas tiene más éxito después de la remisión. Otros ejemplos no limitantes incluyen otros tipos de células apropiadas, tales como células inmunitarias no modificadas, células inmunitarias modificadas que comprenden vectores que expresan una o más moléculas inmunorreguladoras, o células con CAR específicas para un antígeno diferente de los divulgados en el presente documento. Al igual que con las células con CAR de la presente divulgación, en algunas realizaciones, estas células pueden ser autólogas o alogénicas. Los regímenes de tratamiento adecuados estarán determinados por el médico o veterinario tratante.

Los métodos se pueden personalizar mediante la identificación primero del paciente que recibirá la terapia. En un aspecto, el sujeto o paciente es un animal, un mamífero,

un canino, un felino, un bovino, un equino, un murino o un paciente humano. En este aspecto, se aísla una muestra de células cancerosas o tumorales del paciente para determinar si la célula expresa FLT3 y/o PD-1 y/o PD-L1. Si se determina que la célula expresa uno o más de estos marcadores, se selecciona al paciente para recibir la terapia y se administra la terapia. Se conocen en la materia métodos para determinar la expresión de los marcadores. Algunos de dichos métodos se describen en el presente documento.

10

En algunas realizaciones, las células con CAR de FLT3 se administran con un inhibidor de FLT3. Sin quedar unidos a la teoría, se cree que dicho inhibidor puede aumentar la expresión en la superficie de FLT3 en las células diana. Ejemplos no limitantes de inhibidores de FLT3 incluyen gilteritinib (Astellas), quizaritinib (Ambit Biosciences), midostaurin (Novartis), sorafenib (Bayer y Onxy Pharmaceuticals), sunitinib (Pfizer), lestarutinib (Cephalon), FF-10101 (Fuijfilm), y dovitinib (Novartis u Oncology Venture).

20

En determinadas realizaciones, el paciente o sujeto mantiene o recupera la hematopoyesis normal después de recibir, es decir, de administrarle, la cantidad eficaz de la célula aislada. La hematopoyesis normal es un criterio de valoración esencial para determinados cánceres, tales como, pero sin limitación, cánceres que afectan a la sangre o la médula ósea, por ejemplo, linfoma o leucemia, tales como, pero sin limitación, leucemia mieloide aguda o leucemia linfoblástica aguda. Los métodos para determinar la "hematopoyesis normal" después del tratamiento son conocidos en la materia e incluyen, pero sin limitación, un análisis de sangre de "pinchazo" que

30

compara los recuentos de células sanguíneas iniciales con los recuentos de células sanguíneas posteriores al tratamiento y/o comparaciones similares para células CD34+ circulantes. Otros métodos ilustrativos no limitantes incluyen biopsia de médula ósea para verificar el injerto. La imposibilidad de mantener o recuperar la hematopoyesis normal (también conocida como injerto normal) se asocia con la necesidad recurrente de transfusiones y/o la necesidad de antibióticos y/o alta morbilidad y mortalidad, además de indicadores sintomáticos tales como, pero sin limitación, anemia, palidez, hipotensión ortostática y sangrado y/o hematomas debido a la falta de recuperación plaquetaria. La hematopoyesis y/o injerto normal pueden definirse mediante un umbral clínicamente aceptable, tal como, pero sin limitación, un recuento sostenido de granulocitos de $> 1,0 \times 10^9/l$, un recuento sostenido de plaquetas de $> 50 \times 10^9$, un nivel sostenido de hemoglobina de ~ 9 o 10 g/dl, y/o la ausencia de necesidad de transfusiones de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la hematopoyesis normal se define por una falta de agotamiento significativo de células Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA-. En algunas realizaciones, la hematopoyesis a largo plazo adecuada o el injerto hematopoyético a largo plazo exitoso pueden correlacionarse con un número suficiente de células Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA- en el producto hematopoyético que se infunde en un sujeto después de la preparación mielosupresora para el trasplante de células madre.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar de una manera adecuada para la enfermedad que se va a tratar o prevenir. La cantidad y frecuencia de administración vendrá determinada por factores

tales como el estado del paciente y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis adecuadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos. En un aspecto, se administran directamente mediante inyección directa o de manera
5 sistémica, tal como infusión o inyección intravenosa.

La dosis total de células que expresan CAR puede variar dependiendo de, por ejemplo, los factores divulgados anteriormente. En algunas realizaciones, las dosis pueden ser
10 del orden de 1 a 10^{10} células, por ejemplo, al menos 10, al menos 10^1 , al menos 10^2 , al menos 10^3 , al menos 10^4 , al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , como máximo 10^8 , como máximo 10^9 , como máximo 10^{10} , entre 10^2 y 10^{10} , entre 10^3 y 10^9 , entre 10^4 y 10^8 . En algunas realizaciones, la dosis puede estar además
15 limitada por un coeficiente entero del orden de magnitud, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, dando como resultado un intervalo de dosis enumerado de acuerdo con el siguiente ejemplo no limitativo: entre 5×10^4 y 1×10^8 .

20 *Gen suicida.* En realizaciones que implican un gen suicida como parte de la secuencia de ácido nucleico aislada que codifica el CAR, el gen suicida puede utilizarse para terminar las células que expresan CAR al final de la terapia. En aspectos del método que implican células que expresan CAR que comprenden
25 el gen suicida, el gen suicida puede inducirse mediante la introducción de la molécula inductora en el punto en el que ya no se necesita la respuesta de la célula con CAR específica de FLT3. La inducción del gen suicida da como resultado la apoptosis de las células con CAR. Por tanto, se contempla que
30 el uso de construcciones CAR que comprenden un gen suicida inducible puede mejorar la seguridad de la aplicación de

células con CAR mediante la eliminación de las células que expresan CAR mediante apoptosis inducida. En realizaciones donde se usa un agente inductor, tal como, pero sin limitación, una molécula pequeña, la dosis del agente inductor aplicado para inducir la expresión de suicidio puede variar entre 0,001 y 10,0 mg/kg de peso corporal, o alternativamente entre 0,01 y 1,0 mg/kg, y varía entre ellos.

Aplicaciones diagnósticas. Aspectos de la divulgación proporcionan un método ilustrativo para determinar si es probable que un paciente responda o no responda a, terapia con CAR de FLT3. En realizaciones específicas, este método comprende poner en contacto una muestra biológica aislada del paciente con una cantidad eficaz de un anticuerpo contra FLT3 y/o PD-L1 y/o PLD1 y detectar la presencia de cualquier anticuerpo unido a la muestra de cáncer/tumor. En algunas realizaciones, la muestra tumoral es cualquier muestra biológica, incluyendo células cancerosas/tumorales, por ejemplo, una biopsia tumoral, células tumorales/cancerosas circulantes y/o cualquier otro líquido o tejido corporal que pueda comprender las células. En realizaciones adicionales, la presencia de un anticuerpo o anticuerpos unidos a la muestra de cáncer/tumor indica que es probable que el paciente responda a la terapia con CAR de FLT3 y la ausencia de anticuerpo unido a la muestra tumoral indica que no es probable que el paciente responda a la terapia con CAR de FLT3. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede unirse a entre el 0 % y el 100 % de la muestra de cáncer/tumor tomada del paciente que puede comprender células que son positivas para FLT3; en dichas realizaciones, debe entenderse que cuanto mayor sea el porcentaje de células tumorales positivas para FLT3 y/o PD-1

y/o PD-L1, mayor probabilidad de que la terapia con CAR de FLT3 sea eficaz. En algunas realizaciones, la muestra de cáncer/tumor comprende blastocitos leucémicos. En realizaciones adicionales, la detección de más o

5 aproximadamente un 90 % de blastocitos leucémicos que expresan FLT3 y/o la detección de al menos un 50 % de PD-1 y/o PD-L1 indica que un paciente tiene un "margen terapéutico" favorable para la terapia con CAR de FLT3. En algunas realizaciones, el método implica el uso de ensayos de diagnóstico, marcadores o

10 perfiles de expresión génica asociados con un tumor o cáncer - un ejemplo no limitante es cuantificar la población de células que expresan CD45^{dim}SSC^{medio} utilizando citometría de flujo u otro método de separación celular para determinar si ha habido una reducción de la AML en relación con la población de referencia

15 de estas mismas células. En algunas realizaciones, el método comprende la etapa adicional de administrar una cantidad eficaz de las células que expresan CAR de FLT3 y el anticuerpo divulgado en el presente documento a un paciente que se determina que es probable que responda a la terapia con CAR de

20 FLT3. En algunas realizaciones, el paciente tiene y/o se le diagnostica un cáncer/tumor que expresa FLT3. En algunas realizaciones, el cáncer/tumor es un linfoma o leucemia, tal como, pero sin limitación, AML o ALL.

25 Kits

Como se define en el presente documento, la presente divulgación proporciona métodos para producir y administrar células con CAR de FLT3 y un anticuerpo o fragmento de unión a

30 antígeno del mismo que comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1. En un aspecto

particular, la presente divulgación proporciona kits para realizar estos métodos así como instrucciones para llevar a cabo los métodos de la presente divulgación tales como recoger células y/o tejidos, y/o realizar la
5 selección/transducción/etc., y/o analizar los resultados.

En un aspecto, el kit comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, uno cualquiera de los ácidos nucleicos aislados divulgados en el
10 presente documento y/o uno o más vectores que comprenden dicho ácido nucleico y/o células alogénicas aisladas, preferentemente linfocitos T o células NK, y/o instrucciones sobre la obtención de células autólogas de un paciente. En otro aspecto, en el presente documento se divulgan kits que
15 comprenden, o de forma alternativa consisten esencialmente en, o incluso consisten además en la composición tal como se divulga en el presente documento y, opcionalmente, instrucciones de uso. Dicho kit también puede comprender, o de forma alternativa consistir esencialmente en, o incluso
20 comprender además medios y otros reactivos adecuados para la transducción y/o selección y/o activación y/o expansión de células que expresan CAR de FLT3, tales como los divulgados en el presente documento.

25 En un aspecto, el kit comprende, o de forma alternativa consiste esencialmente en, o incluso consiste además en, una célula que expresa CAR aislada o una población de la misma. En algunas realizaciones, las células del presente kit pueden requerir activación y/o expansión antes de la administración a
30 un sujeto que lo necesite. En realizaciones adicionales, el kit puede comprender además, o consistir esencialmente en,

medios y reactivos, tales como los descubiertos en la divulgación anterior, para activar y/o expandir la célula aislada que expresa CAR. En algunas realizaciones, la célula se utilizará para la terapia con CAR de FLT3. En realizaciones adicionales, el kit comprende instrucciones sobre la administración de la célula aislada a un paciente que necesita la terapia con CAR de FLT3.

Los kits de la presente divulgación también pueden comprender, por ejemplo, un agente tamponante, un conservante o un agente estabilizador de proteínas. Los kits pueden comprender además componentes necesarios para detectar el marcador detectable, por ejemplo, una enzima o un sustrato. Los kits también pueden contener una muestra de control o una serie de muestras de control, que se pueden analizar y comparar con la muestra de ensayo. Cada componente de un kit puede estar encerrado dentro de un recipiente individual y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de un solo envase, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos realizados con el kit. Los kits de la presente divulgación pueden contener un producto escrito sobre o en el recipiente del kit. El producto escrito describe cómo utilizar los reactivos contenidos en el kit.

Según sea conveniente, estos componentes del kit sugeridos pueden empaquetarse de una manera habitual para usar por los expertos en la materia. Por ejemplo, estos componentes del kit sugeridos se pueden proporcionar en solución o como una dispersión líquida o similar.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de

procedimientos que pueden usarse en varios casos para llevar a cabo la divulgación.

EJEMPLO 1 - CAR CON FLT3 Y PD-1/PD-L1 SECRETADO

5

Los linfocitos T con CAR de FLT3 no solo inducen una citotoxicidad dependiente del tiempo y dependiente de la dosis contra la línea celular FLT3(+) de AML, sino también destruyen hasta un 40 % de los blastocitos primarios de pacientes con AML FLT3(+) en tan solo 4 horas. Más importante aún, el solicitante había descubierto que las células NK con CAR o las células NK en cultivo prolongado expresaban cantidades sustanciales de la proteína PD-1 de punto de control, que es una señal inhibidora en las células NK de pacientes con cáncer, mientras que los blastocitos de AML expresaron PD-L1 en la superficie celular. De estas plataformas biespecíficas anteriores y otros grupos, la principal preocupación del anticuerpo biespecífico ("biAb") es la corta semivida, que limita la biodisponibilidad y eficacia. Por lo tanto, el solicitante buscó superar esta limitación técnica y proporcionar una actividad citolítica sinérgica contra la AML a través de una mayor interacción, mayor activación e inhibición de los puntos de control antagonistas.

25 Eficacia de las células NK con CAR

Se puede evaluar la eficacia de las células NK con CAR que secretan de manera constitutiva biAb anti-PD-1-PD-L1 *in vitro*. Se han generado clones NK-CAR de FLT3 con secreción continua y alta de anticuerpo biespecífico de PD-1-PD-L1 y se puede analizar *in vitro* un aumento en la citotoxicidad contra

30

líneas celulares de AML y blastocitos de pacientes.

Para ello, se generó un biAb anti-PD-1-PD-L1 y se incorporó en el vector lentivírico con CAR de FLT3. El biAb
5 contiene scFv de anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 con un enlazador HMA. La expresión del fragmento scFv anti-PD-1-HMA-scFv anti-PD-L1 se dirige bajo el promotor CMV y el péptido señal de secreción aislado de moléculas de inmunoglobulina humana.

10

Para analizar la eficacia de las células NK con CAR que secretan de manera constitutiva biAb anti-PD-1-PD-L1 *in vitro*, se transducen en las células CAR de FLT3 que lleva nuevos anticuerpos biespecíficos anti-PD-1-PD-L1. Dado que una sola
15 transferencia génica a través del sistema lentivírico es mejor que dos rondas de transducción en términos de eficacia y seguridad, se prefiere un vector de expresión bicistrónico de grado clínico que exprese tanto FLT3 como el biAb. Los linfocitos T con CAR transducidos con dichos vectores
20 bicistrónicos con FLT3 inducen actividades citolíticas potentes y específicas contra las células FLT3(+) de AML. Sin quedar unidos a la teoría, se cree que CAR de FLT3 redirige las células NK contra las dianas FLT3(+), mientras que el biAb anti-PD-1-PD-L1 ataca tanto al efector como la diana y actúa
25 como un inhibidor de punto de control.

También pueden evaluarse el vector de expresión bicistrónico y la inducción de la expresión en la superficie celular de CAR de FLT3 y la secreción continua de anticuerpo
30 biespecífico anti-PD-1-PD-L1. La semivida y la biodisponibilidad de biAb se evalúan debido a su pequeño

tamaño. Sin quedar unidos a la teoría, se cree que la inserción del gen secretor del biAb en el vector con CAR de FLT3 mejora la semivida y la biodisponibilidad del anticuerpo biespecífico.

5 La expresión de CAR de FLT3 se puede determinar mediante tinción con anticuerpo anti-Fab y citometría de flujo. La expresión proteica del biAb se evalúa mediante el bloqueo de la ruta secretora con brefeldina A y la célula se permeabiliza y se tiñe con anticuerpo anti-6XHistidina (6XHis). Se puede
10 utilizar una prueba ELISA para 6XHis para seleccionar los candidatos de alta expresión para biAb anti-PD-1-PD-L1. CAR de FLT3 se detectan en la superficie celular. Cuando las células transducidas se tiñen intracelularmente para el anticuerpo anti-6XHis, se detecta el biAb mediante citometría de flujo y
15 se cuantifica con ELISA. Se prefiere y se selecciona al menos una expresión superior tanto de CAR de FLT3 como de biAb anti-PD-1-PD-L1. El solicitante señala que, en algunos casos, la expresión artificial de las dos proteínas podría estresar las células e iniciar una respuesta de plegamiento incorrecto de
20 las proteínas y podría ocurrir una muerte celular masiva. Esto puede superarse mediante el uso de promotores clínicamente seguros con diferente fuerza impulsora para optimizar la expresión.

25 El solicitante también puede determinar si el tratamiento con CAR de FLT3-biAb PD-1-PD-L1 es mejor que con CAR de FLT3 solo *in vitro*. CAR de FLT3 induce hasta un 40 % de citotoxicidad contra blastocitos de AML del paciente. El nivel de citotoxicidad puede aumentarse aún más si el biAb bloquea los
30 puntos de control inhibidores.

También se puede evaluar una comparación lado a lado de la citotoxicidad contra la línea celular MOLM-13, K562 y U937 de AML, que tienen expresión alta, intermedia y baja de PD-L1 respectivamente, para comparar la citotoxicidad con o sin CAR o biAb anti-PD-1-PD-L1. La producción de IFN- γ en cultivos conjuntos con o sin CAR o anticuerpo biespecífico se puede medir y comparar. Para probar la interacción, las células efectoras previamente marcadas, que sobreexpresan el inserto de biAb secretor (células CAR NK anti-PD-1-PD-L1), y las células de AML previamente marcadas se cultivan conjuntamente durante 30 minutos. A continuación, las células se recogen y se tiñen con un fluoróforo marcado con faloidina. Las células teñidas se analizan con un citómetro de flujo de imágenes Imagestream X Marker II. La frecuencia de la sinapsis inmunitaria se cuantifica y se compara con las células de control después de una estrategia de activación estricta. Para determinar el efecto del bloqueo de PD-1 en las vías de señalización de CAR y células NK, se miden la fosforilación de SHP2 (cadena abajo de la señalización PD-1), AKT (cadena abajo de la señalización CD28) y zap70, cadena abajo de la señalización TCR. La interacción de la expresión de PD-1 endógeno en las células NK con CAR y la expresión de PD-L1 en las células de AML se antagoniza y se observa un aumento en la lisis específica en los cultivos conjuntos en el grupo de tratamiento combinado. La frecuencia de sinapsis inmunitaria en cultivo conjunto con células NK con CAR anti-PD-1-PD-L1 es más alta que el control negativo, incluyendo el control de vector vacío y el control sin diana. La menor expresión de SHP2 se detecta en NK con CAR con biAb, mientras que AKT y zap70 estarán fosforilados, después del tratamiento de biAb anti-PD-1-PD-L1. Mientras que las células NK o los linfocitos T

expresan tanto PD-1 como PD-L1 y, por lo tanto, el biAb anti-PD-1-PD-L1 puede activar el PD-1 o PD-L1 en las células efectoras, el CAR de las células efectoras se redirige solo a la célula FLT3(+), que se limita a las células mieloides y de AML malignas. Esto proporciona especificidad y seguridad.

Las células biespecíficas NK con CAR prolongan la supervivencia

Se analizaron clones NK con CAR (NK92) con PD-1-PD-L1 secretado (NK con CAR de FLT3-biAb) para determinar si las células prolongan la supervivencia en modelos de ratón de células madre leucémicas y xenoinjertos procedentes de pacientes con AML. El solicitante ha descubierto que los ratones con AML tratados con NK con CAR con biAb PD-1-PD-L1 secretado sobreviven más tiempo que aquellos con leucemia sola o tratados con CAR solo.

El solicitante también evaluó si las células NK con CAR de FLT3 inducían una actividad citolítica significativa entre las líneas celulares de AML y blastocitos de pacientes. Los CAR de FLT-3 se construyen y expresan en células NK y linfocitos T CD3(+) primarios humanos. Las células NK con CAR destruyeron específicamente las líneas celulares FLT3(+) de AML MOLM-3 y EOL-1, pero no la línea celular de control negativo U937 (**FIG. 2A**). De forma similar, los linfocitos T con CAR indujeron actividad citolítica contra blastocitos FLT3(+) de pacientes con AML, pero no blastocitos FLT3(-) de AML (**FIG. 2B**). No existe una destrucción significativa contra las células humanas normales, incluyendo células madre hematopoyéticas CD34(+), células dendríticas, células NK y linfocitos B, aunque expresaron FLT-3 (**FIG. 2C**). Estos linfocitos T o células NK

con CAR de FLT3 sugeridas pueden ser seguras.

Las linfocitos T con CAR de FLT3 prolongan la supervivencia de los ratones portadores de células MOLM-13 de AML y blastocitos primarios de AML de pacientes. Se utilizaron ratones NOD-SCID^{IL-2^{γc} -/-} inyectados con líneas celulares de AML o blastocitos primarios de AML como modelos de blastocitos de pacientes con AML. Todos los ratones que llevan células MOLM-13 y linfocitos T con CAR de FLT3 sobrevivieron más de 80 días después de la implantación de las células MOLM-13 de AML (**FIG. 3A**), en comparación con los ratones de control que recibieron linfocitos T transducidos con vector vacío que murieron aproximadamente 20 días después de la implantación de células MOLM-13 de AML. De forma similar, los ratones con blastocitos humanos de AML solo murieron alrededor de los 90 días. Por el contrario, los que recibieron linfocitos T con CAR de FLT3 sobrevivieron más de 120 días sin síntomas de AML (**FIG. 3B**). Los datos del solicitante muestran que CAR de FLT3 se expresa en células NK humanas. Se han determinado resultados similares para las células NK con CAR de FLT3 (**FIG. 3C**).

Las linfocitos T con CAR de FLT3 expresan PD-1 durante la fase de expansión y los blastocitos de AML expresan PD-L1. El solicitante encontró que las células NK con CAR de FLT3 expresan un alto nivel de PD-1 en cultivo. El porcentaje de células NK con CAR PD-1(+) fue superior al 90 % después de 7 días en cultivo (**FIG. 4A**). Las células NK primarias sin transducción de CAR también expresaron PD-1 en presencia de citocinas de cadena gamma (**FIG. 4B**). Además, las líneas celulares de AML expresan PD-L1 a diferentes niveles. Las de alta expresión incluyen K562; y las de baja expresión incluyen

Molm-13 (**FIG. 4C-D**). Estos resultados sugieren que el eje PD-1-PD-L1 juega un posible papel en la citotoxicidad de NK con CAR contra las células de AML. El solicitante también encontró que se podían detectar 10 ng/ml de biAb en los sobrenadantes de cultivo de los linfocitos T transducidos con el vector con biAb 3 días después de la transducción (**FIG. 4E**).

Estos resultados demostraron que las células NK o linfocitos T con CAR de FLT3 podrían proteger de la muerte a la mayoría de los ratones con AML. Sin quedar unidos a la teoría, se cree que al antagonizar PD-1 y PD-L1 con biAb secretado, las células NK con CAR protegen a los ratones de LSC AML (células madre de leucemia en AML).

El solicitante también analizó si el tratamiento con CAR de FLT3-biAb de PD-1-PD-L1 era mejor que el CAR de FLT3 solo en ratones con AML. Los datos muestran que aunque los linfocitos T con CAR de FLT3 pueden prolongar la supervivencia en el modelo de ratones con AML, los linfocitos T con CAR expresan un alto nivel de PD-1. El solicitante también detectó un aumento de la expresión de PD-1 en células NK con CAR. Por lo tanto, el solicitante cree que antagonizar PD-1-PD-L1 con biAb mejora las funciones de CAR y erradica las células AML en un modelo de ratón con AML creado usando una línea celular o un xenoinjerto procedente del paciente.

Se inoculan ratones Nod scid gamma (NSG) con MOLM-13 transducidas con luciferasa, una línea celular FLT3(+) de AML. Una semana después de la inoculación, se inyecta por vía intravenosa NK con CAR de FLT3 con o sin biAb anti-PD-1-PD-L1. La cinética de las células de AML inyectadas es seguida

semanalmente por IVIS Lumina II mediante la medición de las señales de bioluminiscencia de las células de AML. En un momento determinado (guiado desde la toma de imágenes *in vivo*), el solicitante recogió la sangre, médula ósea y bazo, y

5 determinó el número absoluto de células NK y de AML. La expresión de PD-1 en células NK con CAR se determina mediante citometría de flujo en la sangre periférica de las muestras tomadas cada semana. El experimento se puede repetir mediante la inyección de muestras primarias de blastocitos de pacientes

10 con AML estratificadas por el porcentaje de expresión de FLT3. También se puede determinar la expresión de PD-L1 en las células de AML inyectadas. La concentración de biAb anti-PD-1-PD-L1 se mide de forma regular mediante ELISA de células NK con CAR con biAb anti-PD-1-PD-L1 que persiste o prolifera *in*

15 *vivo* mejor que en aquellas sin. La expresión de PD-1 o PD-L1 en células NK con CAR y de AML, respectivamente, no se detecta en NK con CAR con el biAb. Además, la bioluminiscencia de las células de AML es más baja en el grupo NK con biAb-CAR de FLT3. Se muestra una supervivencia libre de enfermedad

20 significativamente más larga en ratones que reciben tratamiento de NK con biAb-CAR de FLT3. Los biAb anti-PD-1-PD-L1 se analizan con regularidad en las muestras de plasma. En algunos casos, el efecto del biAb puede depender del efecto de otras células inmunitarias en las PBMC. En tales casos, el

25 solicitante puede inyectar conjuntamente PBMC autólogas y células NK con biAb-CAR de FLT3 en el modelo de ratón con AML y comparar aquellas sin PBMC inyectadas.

El solicitante también determinó si las células NK con

30 biAb PD-1-PD-L1-CAR de FLT3 destruyen las células madre leucémicas (LSC) y protegen a los ratones de la recaída. Las

células madre leucémicas se describieron por primera vez en la AML como un pequeño subconjunto de blastocitos de AML, por lo general CD34(+)CD38(-)CD123(+), que podrían regenerarse en una población masiva de blastocitos de AML. Esto es clínicamente relevante ya que el tratamiento estándar respeta este compartimento en la AML, que conduce a recaídas y resistencia al tratamiento en el paciente con AML. Es bien conocido que la población de células madre leucémicas enriquecidas lleva una duplicación interna en tándem del gen FLT3.

10

Se realizan ensayos de citotoxicidad *in vitro* utilizando muestras enriquecidas para LSC. Las muestras de pacientes con AML se enriquecen mediante la separación de células CD34(+)CD38(-) CD123(+). Las células NK con CAR de FLT3 o células NK con biAb-CAR de FLT3 se enriquecen mediante la selección de células CD34(+)CD38(+). El solicitante también mide la producción de IFN- γ de los dos grupos de células y compara con las células transducidas con diana sola/efector solo. Se irradian *in vivo*, ratones NOD-SCIDIL2 γ c -/- (tanto hembras como machos) a 100 Rad el día antes de la inyección de células leucémicas. Un día después, las LSC, tal como se definen como CD34(+)CD38(-)CD123(+) y el control negativo CD34(+)CD38(+), se separan de nuevo mediante un clasificador de células por citometría de flujo (BD Aria III) y se inyectarán 1×10^6 células de control o LSC separadas a través de la vena de la cola. A su vez, las células NK primarias se transducen con las construcciones para CAR de FLT3 solo, NK con biAb solo, o biAb-CAR de FLT3. A continuación, los ratones se asignan al azar en 5 grupos diferentes: 1. AML sola, 2. AML + células NK con vector vacío, 3. AML + NK con CAR de FLT3, 4. AML + NK con biAb y 5. AML + NK con biAb-CAR de FLT3. un día después de la

30

infusión de LSC se inyectan por vía intravenosa 1×10^6 células NK transducidas. Después de 12-14 semanas, los injertos se controlan mediante la toma de muestras de sangre periférica. Se controla la supervivencia de los ratones. En el punto final, se analiza la frecuencia de LSC mediante citometría de flujo. Las células NK con biAb-CAR de FLT3 lisan las LSC al menos de manera tan eficaz como las células en el compartimento sin LSC. El tratamiento con CAR y biAb evita la recaída de la AML. Se observa una supervivencia libre de enfermedad más prolongada. En algunos casos, todas las LSC se pueden destruir mediante las células NK con CAR infundidas un día después de la infusión, lo que hace imposible determinar el efecto de la repoblación de LSC. En tales casos, el solicitante puede repetir el experimento pero infundiendo células NK 12-14 semanas después del injerto de LSC.

Seguridad

Se analiza la seguridad de la célula NK con biAb-CAR de FLT3 *in vivo* utilizando un modelo de ratón procedente de pacientes con AML humanizada. No se observó una tormenta de citocinas intensa en ratones tratados con NK con CAR de FLT3 y biAb anti-PD-1-PD-L1.

El solicitante observó que los linfocitos T con CAR de FLT3 no destruyen las células madre CD34(+). Sin quedar unidos a la teoría, los solicitantes creen que NK con biAb-CAR de FLT3 conserva las células madre normales y proporciona citotoxicidad específica contra las células FLT3(+) de AML. Sin embargo, dado que FLT3 se expresa tanto en células mieloides como en células madre, las células NK con CAR de FLT3 se pueden analizar para

determinar si las células madre hematopoyéticas normales están agotadas y corren el riesgo de citopenia.

El solicitante también analiza si NK con CAR de FLT3 con biAb secretor destruirá las células FLT3(+) normales. Sin quedar unidos a la teoría, se cree que antagonizar PD-1/PD-L1 proporciona un efecto sinérgico sobre la activación de CAR. Esto puede aumentar el riesgo de citotoxicidad contra todas las células FLT3(+) normales, incluso si solo pueden expresar débilmente FLT3. En consecuencia, se realizan ensayos de citotoxicidad utilizando NK con biAb-CAR de FLT3 como efectores y células madre CD34(+) normales aisladas de sangre de cordón umbilical como diana a diferente relación efector-diana.

Para validar los datos *in vitro*, se utilizan ratones NSG-SGM3 (NSGS) que expresan GM-CSF, SCF e IL3 humana. Tanto las células madre CD34(+) humanas como las células NK con CAR de FLT3 o NK con biAb-CAR de FLT3 se inyectan por vía intravenosa con 5×10^4 células por ratón. Un mes o tres meses después, todos los ratones se sacrifican y se determina el injerto de células CD45(+) humanas en la médula ósea. El biAb anti-PD-1-PD-L1 no afecta a las células NK con CAR de FLT3 de las células madre hematopoyéticas normales. Además, el porcentaje de células CD45(+) en ratones a los que se les administró NK con CAR de FLT3 con biAb anti-PD-1-PD-L1 secretor es igual o similar al de los que reciben solo CAR de FLT3.

Consideraciones estadísticas

Para todos los cálculos de potencia estadística, las pruebas son de dos caras. El solicitante utiliza

transformaciones logarítmicas para la mayoría de las medidas continuas y transformaciones de raíz cuadrada de arcoseno para los porcentajes, los cuales tienen excelentes propiedades estabilizadoras de la varianza para agrupar la varianza. Aunque se utilizó el método de Bonferroni para controlar el error de tipo I en los cálculos de potencia estadística, en los análisis de datos se utilizará el método de Holm o un método más potente cuando se realicen comparaciones por pares. Se trazan curvas de Kaplan-Meier para mostrar los resultados de supervivencia. Se utilizan modelos lineales de efectos mixtos para detectar la tendencia de cambios en la producción de IFN- γ de las muestras de sangre tomadas repetidamente durante el estudio de supervivencia del ratón. Se utilizarán pruebas t de dos muestras para los análisis. Para estudiar las diferencias en el número de células NK con CAR entre grupos, se incluyen ocho ratones en cada grupo, que logrará un 80 % de poder estadístico para detectar al menos un efecto doble ($\alpha = 0,05/3$ para ajustar para los dos grupos de tratamiento y un grupo de AML solo, CV = 50 %). Se utilizará la prueba t de dos muestras para el análisis.

Análisis

Los resultados del solicitante establecen cómo el biAb anti-PD-1-PD-L1 afecta a las funciones de NK con CAR, dando como resultado el desarrollo de una nueva terapia celular reforzada por CAR y biAb anti-PD-1-PD-L1 contra la AML. Sin quedar unidos a la teoría, se cree que este enfoque es complementario a la persistencia de la funcionalidad de NK con CAR en el microambiente de la AML. La combinación de las ventajas de las tecnologías CAR y biAb hace que el biAb sea

más potente *in vivo*. Se realizaron estudios adicionales con anti-PD-1 y anti-PD-L1 secretados solos, es decir, no como una construcción biespecífica.

5 El biAb anti-PD-1-PD-L1 del solicitante combina las tecnologías CAR y de anticuerpos biespecíficos, donde el biAb secretado de forma constitutiva resuelve posibles problemas en el campo, tal como la semivida corta y la producción y purificación de proteínas costosa. El biAb anti-PD-1-PD-L1
10 contiene capacidad neutralizante para los puntos de control tanto en las células efectoras como en las diana. Es único y el primero en el campo. Los inhibidores del punto de control tienen toxicidad sistémica. Por el contrario, se espera que el biAb anti-PD-1-PD-L1 tenga una baja toxicidad debido a que los
15 efectos de antagonización se limitan únicamente a las células cancerosas en las proximidades de las células efectoras. Mejorar las funciones de las células NK con CAR mediante la antagonización de PD-1/PD-L1 para la terapia celular es innovador y no se ha informado. Este estudio ofrece una mayor
20 sostenibilidad de los efectos terapéuticos. Los estudios de los solicitantes también benefician a otras terapias celulares que utilizan células NK. La expresión celular del biAb de PD-1-PD-L1 en NK con CAR es nueva. El diseño secretor del biAb PD-1-PD-L1 en el vector de expresión permite la secreción
25 ubicua del anticuerpo biespecífico PD-1-PD-L1. De este modo se evita la producción y administración de proteínas para el anticuerpo biespecífico. Esto, a su vez, aumenta enormemente la biodisponibilidad de este pequeño anticuerpo biespecífico.

30 EJEMPLO 2 - Anticuerpos de PD-1 y PD-L1

Se demostró un éxito similar con los anticuerpos de PD-1 y PD-L1 (es decir, no biespecíficos) (**FIG. 8A-8B** y **FIG. 9**). Los estudios anteriores se repiten para los anticuerpos de PD-1 y PD-L1 (es decir, no biespecíficos).

5

EJEMPLO 3 - Administración conjunta de inhibidor de FLT3

Se llevaron a cabo más experimentos para determinar si la expresión de FLT3 aumentaba tras la administración de un inhibidor de FLT3. Los resultados se muestran en la **FIG. 10** y la **FIG. 11**. La **FIG. 10** muestra la detección de la expresión de FLT3 en la superficie en líneas celulares MOLM-13, U937, THP-1, MV4-11 y EOL-1 de AML tratadas con 10 μ M de los inhibidores de FLT3 midostaurina, FF-10101, quizartinib (AC220) y dovitinib (TKI-258) durante 48 horas. La expresión de FLT3 en la superficie se incrementó después de los tratamientos con inhibidores de FLT3. La **FIG. 11** representa la detección de la expresión de FLT3 en la superficie mediante citometría de flujo en muestras de sangre periférica de pacientes que fueron tratados con midostaurina durante 48 horas. La expresión de FLT3 en la superficie se incrementó después del tratamiento.

Equivalentes

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece esta tecnología.

La presente técnica descrita de forma ilustrativa en el presente documento puede practicarse de forma adecuada en

ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no divulgadas específicamente en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, las expresiones "que comprende", "que incluye", "que contiene", *etc.* se leerán de forma amplia y sin limitación. De manera adicional, los términos y expresiones que se han empleado en el presente documento se usan como términos de descripción y no de limitación, y no hay ninguna intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas, o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la presente técnica reivindicada.

Por lo tanto, debe entenderse que los materiales, métodos, y los ejemplos proporcionados en el presente documento son representativos de aspectos preferidos, son ejemplos y no pretenden ser limitaciones en el alcance de la presente tecnología.

La presente técnica se ha descrito en el presente documento en sentido amplio y genérico. También forman parte de la presente técnica cada una de las especies y agrupamientos subgenéricos más restringidos que están dentro de la divulgación genérica. Esto incluye la descripción genérica de la presente técnica con una condición o limitación negativa que elimina cualquier tema del género, independientemente de si el material escindido se menciona específicamente en el presente documento o no.

Además, cuando las características o aspectos de la presente técnica se describen en términos de grupos de Markush,

los expertos en la materia reconocerán que la presente técnica también se describe de esta manera en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

5 Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan expresamente por referencia en su totalidad, en la misma medida que si cada uno se incorporase por referencia individualmente. En caso de conflicto, la presente memoria
10 descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá.

 Otros aspectos se exponen dentro de las siguientes reivindicaciones.

1. Un ácido nucleico aislado o un vector que comprende:
 - a. un polinucleótido que codifica un receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; (b) un dominio de bisagra; (c) un dominio transmembrana; (d) y un dominio intracelular; y
 - b. un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1.
2. El ácido nucleico aislado o el vector de la reivindicación 1, que comprende además (e) un dominio de señalización.
3. El ácido nucleico aislado o el vector de la reivindicación 1 o 2, en donde el CAR comprende además un elemento inducible o uno constitutivamente activo.
4. El ácido nucleico aislado o el vector de la reivindicación 3, en donde el elemento inducible o el constitutivamente activo controla la expresión de un polinucleótido que codifica una molécula inmunorreguladora o una citocina.
5. El ácido nucleico aislado o el vector de la reivindicación 4, en donde la molécula inmunorreguladora o citocina comprende uno o más de B7.1, CCL19, CCL21, CD40L, CD137L, GITRL, GM-CSF, IL-12, IL-2, IL-2 de baja toxicidad, IL-15, IL-18, IL-21, LEC y/o OX40L.

6. El ácido nucleico aislado o el vector de la reivindicación 4, en donde la molécula inmunorreguladora o citocina comprende IL-12 y/o GM-CSF; y/o IL-12 y/o uno o más de IL-2 e IL-2 de baja toxicidad; y/o IL-12 y/o IL-15; y/o IL-12 y/o IL-21; IL-12 y/o B7.1; y/o IL-12 y/o OX40L; y/o IL-12 y/o CD40L; y/o IL-12 y/o GITRL; y/o IL-12 y/o IL-18; y/o una o más de IL-2 e IL-2 de baja toxicidad y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o IL-15 y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o IL-21 y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o GM-CSF y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o OX40L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o CD137L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o comprende B7.1 y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o CD40L y una o más de CCL19, CCL21 y LEC; y/o GITRL y una o más de CCL19, CCL21 y LEC.
7. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el dominio de bisagra comprende un dominio de bisagra CD8 α .
8. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana CD8 α .
9. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la región de señalización coestimuladora comprende una región de señalización coestimuladora CD28 y/o una región de señalización coestimuladora 4-1BB
10. El ácido nucleico aislado o el vector de la reivindicación 1, en donde el CAR comprende: (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; (b) un dominio de bisagra CD8 α ; (c)

un dominio transmembrana CD8 α ; y (d) una región de señalización coestimuladora CD28 y/o una región de señalización coestimuladora 4-1BB.

5 11. El ácido nucleico aislado o el vector de la reivindicación 2, en donde el CAR comprende: (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de FLT3; (b) un dominio de bisagra CD8 α ; (c) un dominio transmembrana CD8 α ; (d) una región de señalización coestimuladora CD28 y/o una región de señalización
10 coestimuladora 4-1BB; y (e) un dominio de señalización CD3 zeta.

12. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el dominio de unión a
15 antígeno del anticuerpo de FLT3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

una CDHR1 que tiene la secuencia de aminoácidos (SYWMH) o (NYGLH) o un equivalente de cada una de las mismas,

una CDHR2 que tiene la secuencia de aminoácidos
20 (EIDPSDSYKDYNQKFKD) o (VIWSGGSTDYNAAFIS) o un equivalente de cada una de las mismas, y

una CDHR3 que tiene la secuencia de aminoácidos (AITTTPDFD) o (GGIYYANHYYAMDY) o un equivalente de cada una de las mismas, y/o una región variable de cadena ligera que
25 comprende:

una CDLR1 que tiene la secuencia de aminoácidos (RASQSI>NNLH) o (KSSQSLLNSGNQKNYM) o un equivalente de cada una de las mismas,

una CDLR2 que tiene la secuencia de aminoácidos
30 (YASQSI) o (GASTRES) o un equivalente de cada una de las mismas, y

una CDLR3 que tiene la secuencia de aminoácidos (QQSNTWPYT) o (QNDHSYPLT) o un equivalente de cada una de las mismas.

5 13. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 comprende un antagonista de PD-1 y/o un antagonista de PD-L1, y/o un equivalente de cada uno de los mismos.

10

14. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el dominio de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 comprende regiones CDR de un anticuerpo contra
15 PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada una de las mismas.

15. El ácido nucleico aislado o vector de la reivindicación 14, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 comprende una región variable
20 de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y/o PD-L1, y/o un equivalente de cada una de las mismas.

16. El ácido nucleico aislado o vector de la reivindicación 14 o 15, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno
25 que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y/o un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y/o un equivalente
30 de cada uno de los mismos.

17. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el anticuerpo que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1 es un anticuerpo biespecífico.

5

18. El ácido nucleico aislado o vector de la reivindicación 17, en donde el anticuerpo biespecífico del mismo comprende un antagonista de PD-1 y un antagonista de PD-L1, y, opcionalmente, comprende además un enlazador.

10

19. El ácido nucleico aislado o vector de la reivindicación 17, en donde el anticuerpo biespecífico del mismo comprende regiones CDR de un anticuerpo contra PD-1 y PD-L1, y, opcionalmente, comprende además un enlazador.

15

20. El ácido nucleico aislado o vector de la reivindicación 19, en donde el anticuerpo biespecífico comprende una región variable de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo contra PD-1 y PD-L1 y, opcionalmente, comprende además un enlazador.

20

21. El ácido nucleico aislado o vector de la reivindicación 20, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-1 y un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de PD-L1 y, opcionalmente, comprende además un enlazador.

25

30

22. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el vector es un plásmido.

23. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el vector es un vector vírico seleccionado de un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector vírico adenoasociado.

24. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el vector es bicistrónico.

25. El ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, que comprende además un promotor y/o potenciador unido operativamente al polinucleótido que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno que reconoce y se une a PD-1 y/o PD-L1.

26. Una célula aislada que comprende el ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

20

27. La célula aislada de la reivindicación 26, en donde la célula es una célula procariota.

28. La célula aislada de la reivindicación 26, en donde la célula es una célula eucariota.

25

29. La célula aislada de la reivindicación 28, en donde la célula eucariota se selecciona de una célula animal, una célula de mamífero, una célula bovina, una célula felina, una célula canina, una célula murina, una célula equina o una célula humana.

30

30. La célula aislada de la reivindicación 28 o 29, en donde la célula eucariota es una célula inmunitaria, opcionalmente un linfocito T, un linfocito B, una célula NK, una célula
5 dendrítica, una célula mielóide, un monocito o un macrófago.

31. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, en donde la célula aislada expresa el CAR y secreta un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo
10 biespecífico.

32. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31, en donde la celda ha sido activada.

15 33. Una población de células expandida de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32.

34. Una población de células sustancialmente homogénea de la reivindicación 33.

20

35. Un anticuerpo que comprende una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos de (Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E W M G G I N P S
25 N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A Y M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
30 I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K R) o un equivalente de la misma.

36. Un anticuerpo que comprende una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos

5 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGTLVTVSAGGG
GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGGEAPR
LLIYLAstyleSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEI
K)

10 o un equivalente de la misma.

37. Un anticuerpo que comprende una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) codificada por la secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico

15 (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT
TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC
CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA
CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACCTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG
GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC
20 GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG
TGCGGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC
CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
ATGTGTCAACCGCTGTGCGCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
CTACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG
25 ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC
AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG),

o un equivalente de la misma.

38. Un anticuerpo que comprende una secuencia de fragmento
30 variable de cadena única (scFv) codificada por la secuencia de nucleótidos:

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
 TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTATGC
 TGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
 5 CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC
 CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
 CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
 10 TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGAGTGGG
 TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
 ATTGCCAACATTCACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA
 A), o un equivalente de la misma.

15 39. Un anticuerpo biespecífico que comprende una secuencia de
 fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una
 secuencia de aminoácidos de: S (Q V Q L V Q S G V E V K K P G
 A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E
 W M G G I N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T
 20 T A Y M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D
 Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M
 T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W
 Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G
 S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T
 25 F G Q G T K V E I K R) y/o
 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSAGGG
 GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPR
 LLIYLAstyleSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLP LTFGGGTKVEI
 30 K), o un equivalente de cada una de las mismas.

40. Un anticuerpo biespecífico que comprende una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) codificada por la secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico:

5 (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT
TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC
CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA
CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG
GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC
10 GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG
TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC
CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
ATGTGTCAACCGCTGTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
CTACTCAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG
15 ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC
AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)

y/o

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
20 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCCACCTACTATGC
TGATTGAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC
CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
25 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAGGTGTCA
GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG
TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
ATTGCCAACATTCACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA

30 A) o un equivalente de las mismas.

41. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 40, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgA, uno IgD, uno IgE, uno IgG o uno IgM.

5 42. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 41, en donde el anticuerpo comprende una región constante.

43. El anticuerpo de la reivindicación 42, en donde la región constante comprende una región constante de IgA, una de IgD,
10 una de IgE, una de IgG o una de IgM.

44. El anticuerpo de la reivindicación 42 o 43, en donde la región constante es una región constante de IgG1 o una región constante kappa de Ig.

15

45. Un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 44.

46. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones
20 35 a 45, en donde el anticuerpo es un anticuerpo policlonal, uno monoclonal o uno humanizado.

47. Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 46.

25

48. El fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 47, en donde el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab', scFv y Fv.

30 49. Un fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos: (Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V

K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E W M G
 G I N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A Y
 M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G
 Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S
 5 P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q
 K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T
 D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q
 G T K V E I K R) o un equivalente de cada una de las mismas.

10 50. Un fragmento de unión a antígeno que comprende una
 secuencia de aminoácidos:
 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTTLVTVSAGGG
 GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPR
 15 LLIYLAstyleSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEI
 K),
 o un equivalente de cada una de las mismas.

51. Un fragmento de unión a antígeno codificado por la
 20 secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de ácido
 nucleico:
 (CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT
 TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC
 CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA
 25 CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACCTGACTCAAGTACGACTACAGCATAACATG
 GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC
 GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG
 TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTGAGGTGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC
 CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
 30 ATGTGTCAACCGCTGTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
 CTA CTACAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG

ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC
AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)

o un equivalente de cada una de las mismas.

5 52. Un fragmento de unión a antígeno codificado por la
secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de ácido
nucleico:

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
10 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCACCTACTATGC
TGATTCAGTAAAAGGACGGTTCACTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC
CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
15 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG
TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
ATTGCCAACATTCACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTGAAATAAA

20 A) o un equivalente de cada una de las mismas.

53. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos
de: o 47 45 (Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S
G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A P G Q G L E W M G G I N P S N G
25 G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A Y M E L K S L Q
F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V
S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S
V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K
L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
30 S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K

R) o

(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSAGGG
 GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGEAPR
 LLIYLAstyleSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEI

5 K), o un equivalente de cada una de las mismas.

54. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de
 ácido nucleico de:

(CAGGTCCAATTGGTACAGAGCGGCGTCGAAGTAAAGAAGCCTGGAGCCAGCGTTAAAGTT
 10 TCTTGCAAGGCTTCAGGATATACTTTCACTAACTACTATATGTACTGGGTACGGCAGGCTC
 CAGGGCAAGGGTTGGAGTGGATGGGAGGGATCAATCCTTCTAACGGCGGCACTAACTTTAA
 CGAAAAATTTAAAAATAGGGTGACCCTCACAACTGACTCAAGTACGACTACAGCATACATG
 GAACTCAAATCTCTCCAATTCGATGACACGGCTGTCTATTATTGCGCGAGAAGAGACTATC
 GCTTCGATATGGGGTTTGATTATTGGGGGCAAGGTACTACGGTTACCGTCAGCTCCGGGGG
 15 TGGCGGCTCCGGCGGCGGTGGGTCAGGTGGAGGAGGGTCTGACATTCAGATGACGCAATCC
 CCAAGCTCTCTGTCCGCGTCAGTGGGCGACCGAGTTACAATCACATGCCGCGCTTCTCAAG
 ATGTGTCAACCGCTGTGCGCTGGTACCAACAGAAGCCTGGGAAGGCCCTAAGCTTCTCAT
 CTA CT CAGCTTCTTTTCTGTACTCAGGGGTACCGTCTAGATTCTCAGGATCCGGTAGTGGG
 ACGGACTTCACATTGACCATAAGTTCCTTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATATTATTGCC
 20 AACAGTACCTTTACCATCCTGCCACTTTTGGCCAGGGTACTAAGGTCGAGATCAAACGG)
 O

(GAAGTTCAGTTGGTCGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAACCCGGGGGCTCACTCCGGTTG
 TCCTGTGCTGCTTCAGGATTTACGTTTTCTGACTCATGGATACATTGGGTGCGCCAAGCCC
 CGGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCTGGATCTCTCCGTATGGGGGTTCACCTACTATGC
 25 TGATTCAGTAAAAGGACGGTTCCTATAAGCGCGGATACAAGTAAGAATACTGCCTATCTT
 CAAATGAATTCTCTTCGCGCCGAGGATACAGCGGTATATTATTGCGCTAGACGACATTGGC
 CAGGGGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTTGTGACCGTTAGTGCGGGAGGTGGTGG
 CAGCGGTGGAGGCGGCTCCGGGGGTGGTGGTTCAGAAATTGTCCTGACTCAATCCCCTGCC
 ACATTGAGTTTGAGCCCAGGAGAGAGAGCAACTCTGTCATGCCGGGCGTCAAAAGGTGTCA
 30 GTACGTCAGGCTACTCCTATCTTCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGAGAAGCGCCGCGCCT
 TCTCATATACCTGGCTAGTTACCTTGAGAGTGGCGTCCCGGCCCGGTTTAGTGGGAGTGGG

TCTGGGACTGATTTTACGCTGACAATCAGCAGTCTTGAGCCAGAGGACTTCGCGGTTTACT
ATTGCCAACATTACGCGATTTGCCCTCACCTTCGGCGGTGGAACGAAGGTTGAAATAAA

A) o un equivalente de cada una de las mismas.

- 5 55. Una composición que comprende el ácido nucleico aislado o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 o 54, el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 46, el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 47 a 52, el polipéptido de la reivindicación
- 10 53, la célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32 y/o la población de células de la reivindicación 33 o 34, y, opcionalmente, un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 15 56. La composición de la reivindicación 55, que comprende además una cantidad eficaz de un inhibidor de FLT3, seleccionado opcionalmente del grupo que consiste en quizaritinib, midostaurina, FF-10101 y dovitinib.
- 20 57. Un complejo aislado que comprende la célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32 unida a una célula que expresa FLT3 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o un fragmento de los mismos.
- 25 58. Un complejo aislado que comprende la célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32 unida a FLT3 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o un fragmento de los mismos.
59. Un método para producir una célula que expresa CAR que
- 30 comprende transducir una célula aislada con el ácido nucleico aislado o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones

1 a 25.

60. El método de la reivindicación 59, en donde las células
aisladas se seleccionan de un grupo que consiste en linfocitos
5 T, linfocitos B, células NK, células dendríticas, células
mieloides, monocitos o macrófagos.

61. Un método para inhibir el crecimiento de un cáncer o tumor
que expresa FLT3, opcionalmente leucemia mieloide aguda (AML)
10 en un sujeto, que comprende poner en contacto el cáncer o tumor
con la célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones
26 a 32 o la composición de la reivindicación 55 o 56.

62. Un método para inhibir el crecimiento de un cáncer o tumor
15 que expresa FLT3 en un sujeto, opcionalmente leucemia mieloide
aguda (AML), que comprende medir la expresión de PD-1 y/o PD-
L1 en el sujeto y administrar la célula aislada de una
cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, el anticuerpo de
una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 46, el fragmento
20 de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones
47 a 52 y/o la composición de la reivindicación 55 o 56 a un
sujeto que expresa PD-1 y/o PD-L1.

63. Un método para inhibir el crecimiento de un cáncer o tumor
25 en un sujeto, opcionalmente leucemia mieloide aguda (AML), que
comprende medir la expresión de PD-1 y/o PD-L1 en el sujeto y
administrar el anticuerpo de una cualquiera de las
reivindicaciones 35 a 46, el fragmento de unión a antígeno de
una cualquiera de las reivindicaciones 47 a 52 y/o la
30 composición de la reivindicación 55 o 56 a un sujeto que expresa
PD-1 y/o PD-L1.

64. El método de la reivindicación 61, donde el contacto es *in vitro* o *in vivo*.

5 65. El método de la reivindicación 64, en donde el contacto es *in vivo* y las células aisladas son autólogas de un sujeto en tratamiento.

66. El método de la reivindicación 65, en donde el contacto
10 es *in vivo* y las células aisladas son alogénicas para un sujeto en tratamiento.

67. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 61 a 66, que comprende además administrar al sujeto una cantidad
15 eficaz de una terapia citorreductora.

68. El método de la reivindicación 67, en donde la terapia citorreductora comprende quimioterapia, crioterapia, hipertermia, terapia dirigida y/o radioterapia.

20

69. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 61 a 68, en donde el sujeto es un paciente humano.

70. Un kit que comprende la composición como se divulga en el
25 presente documento y, opcionalmente, instrucciones de uso.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA INMUNOTERAPIA DIRIGIDA A FLT3,

PD-1, Y/O PD-L1

5

Las células con CAR que se dirigen a antígenos FLT3 en combinación con anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 secretados o anticuerpos biespecíficos anti-PD-1-anti-PD-L1 se describen como un nuevo método de tratamiento del cáncer. Se propone que
10 estas terapias de combinación son seguras y eficaces en pacientes y pueden usarse para tratar tumores y cáncer humanos.



FIG. 1

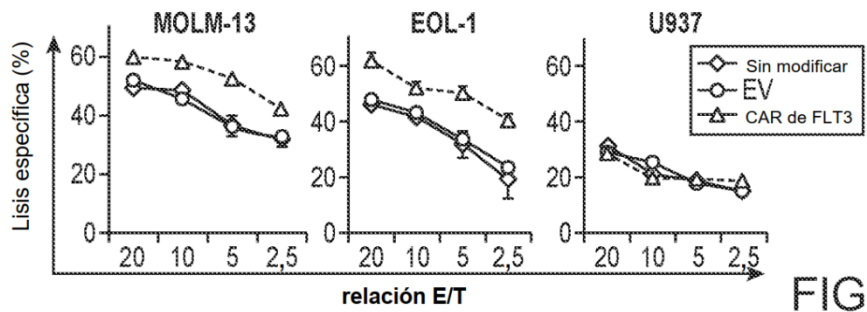


FIG. 2A

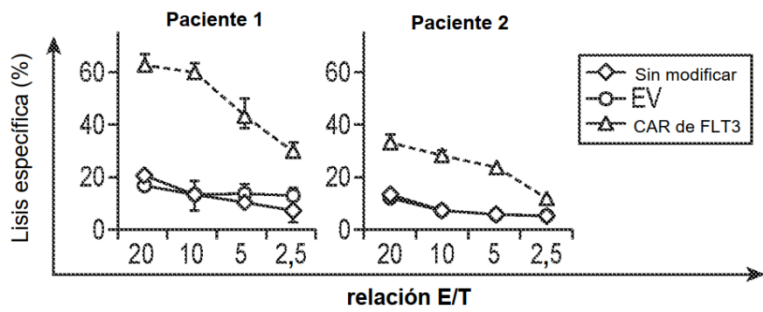


FIG. 2B

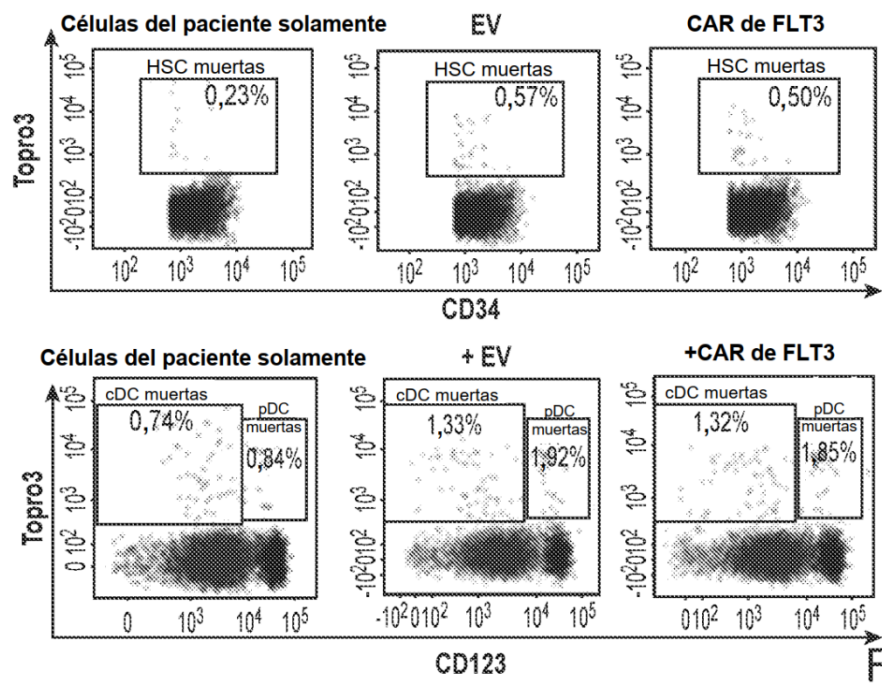
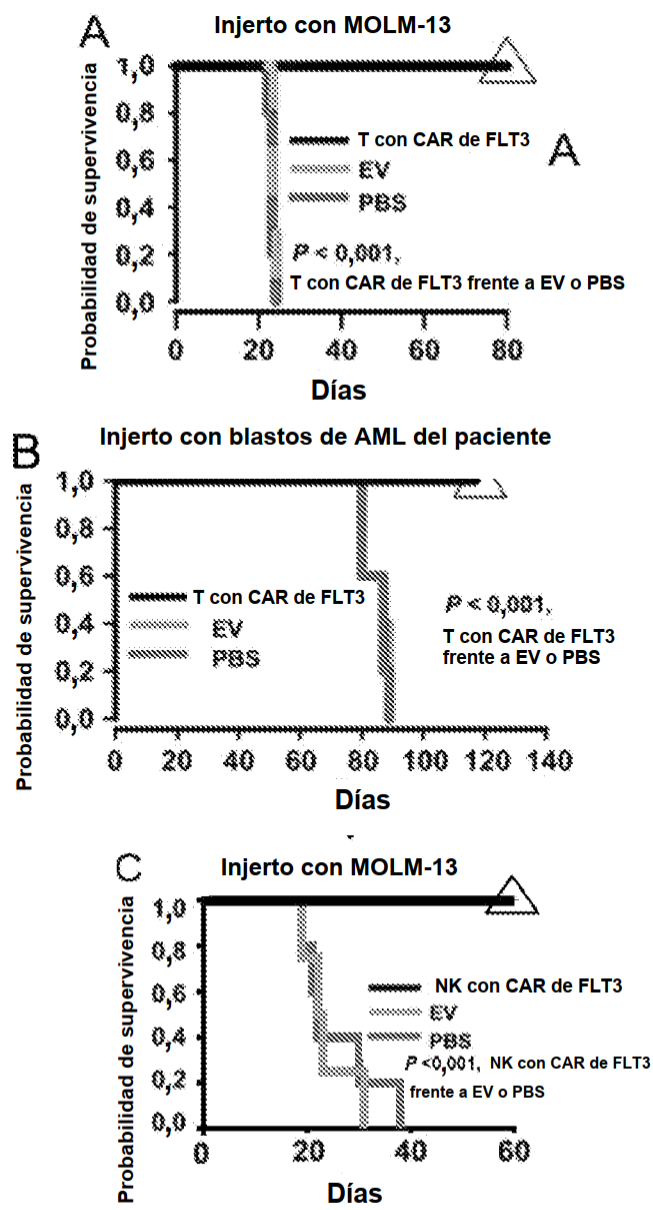


FIG. 2C



FIGS. 3A-3C

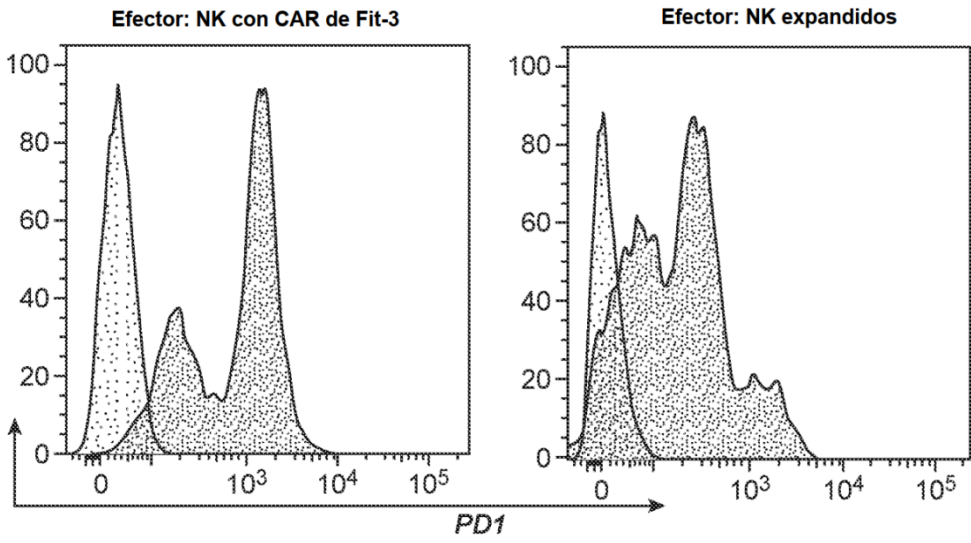


FIG. 4A

FIG. 4B

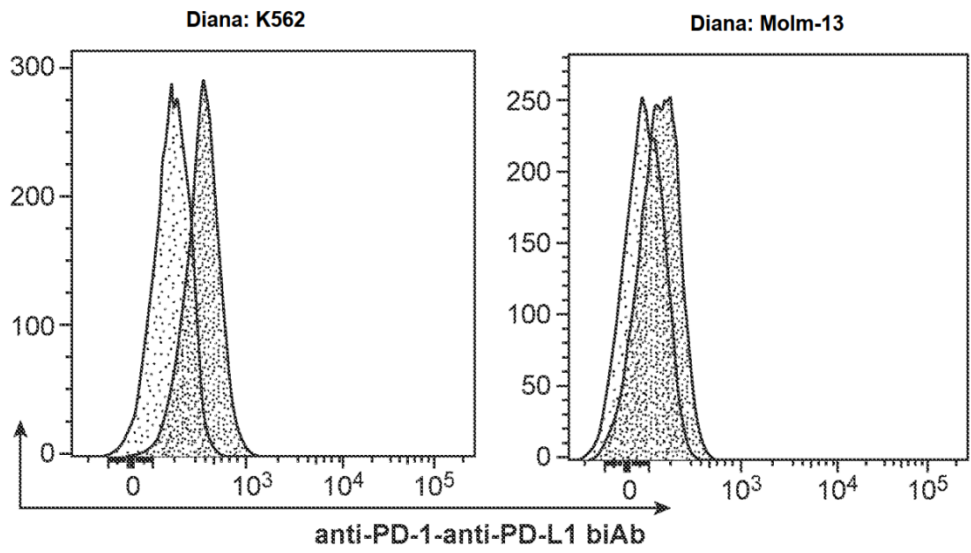
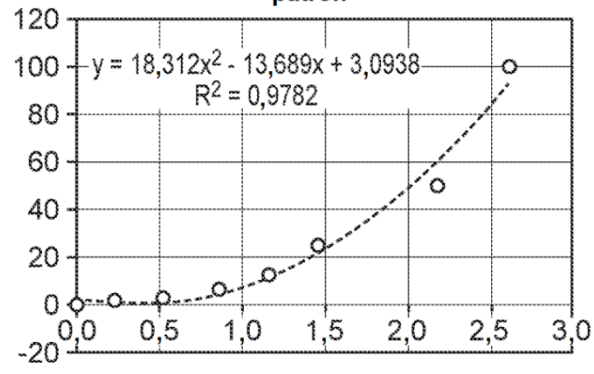


FIG. 4C

FIG. 4D

244

patrón



patrón

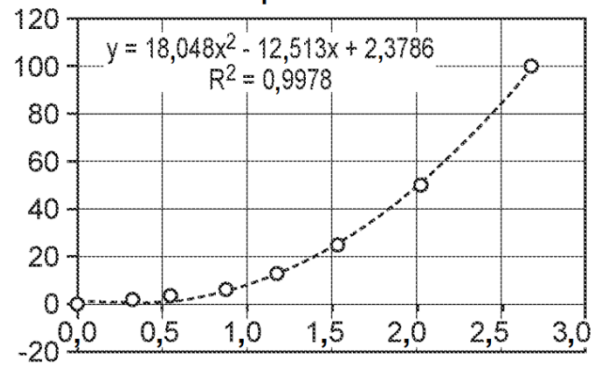


FIG. 5A

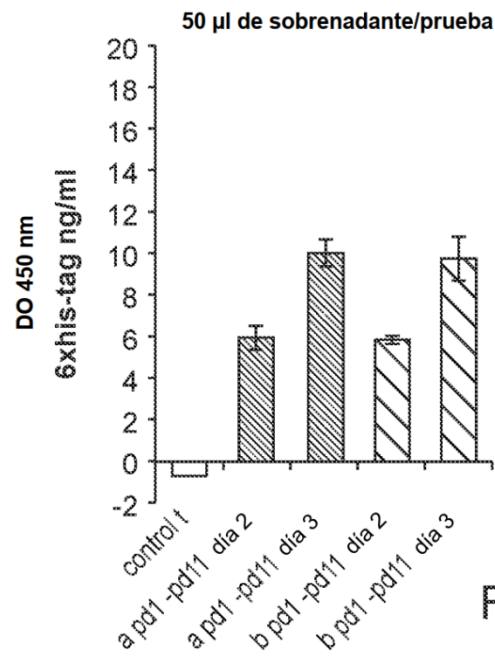


FIG. 5B

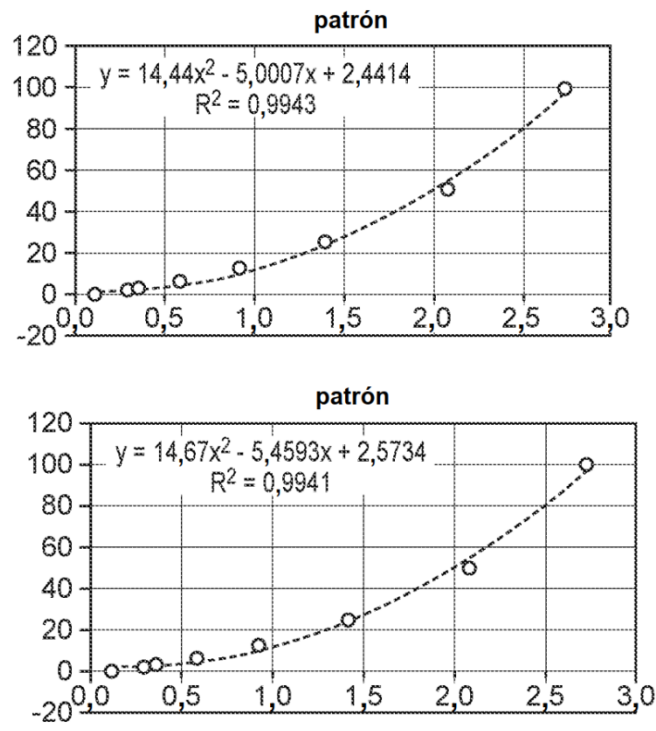


FIG. 6A

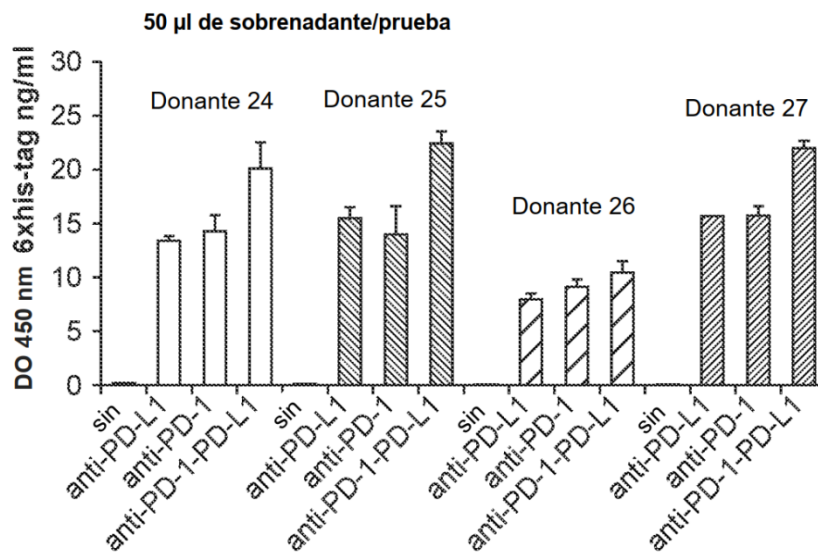


FIG. 6B

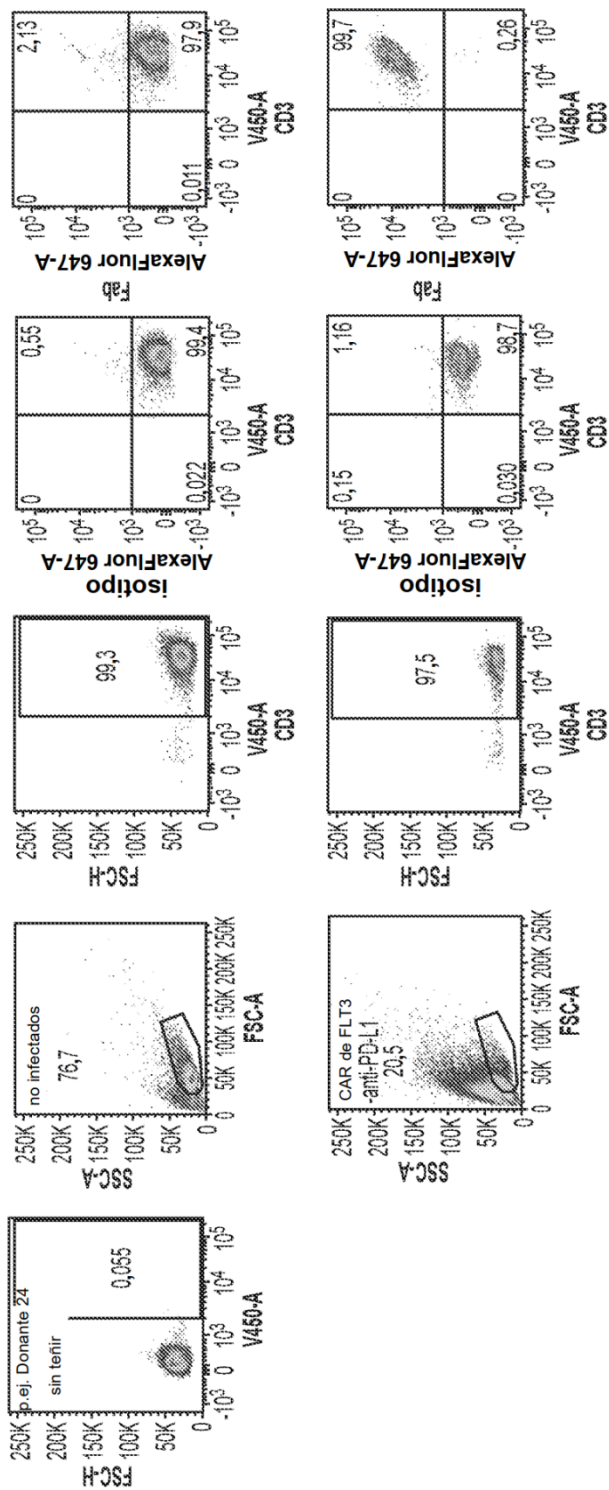


FIG. 7

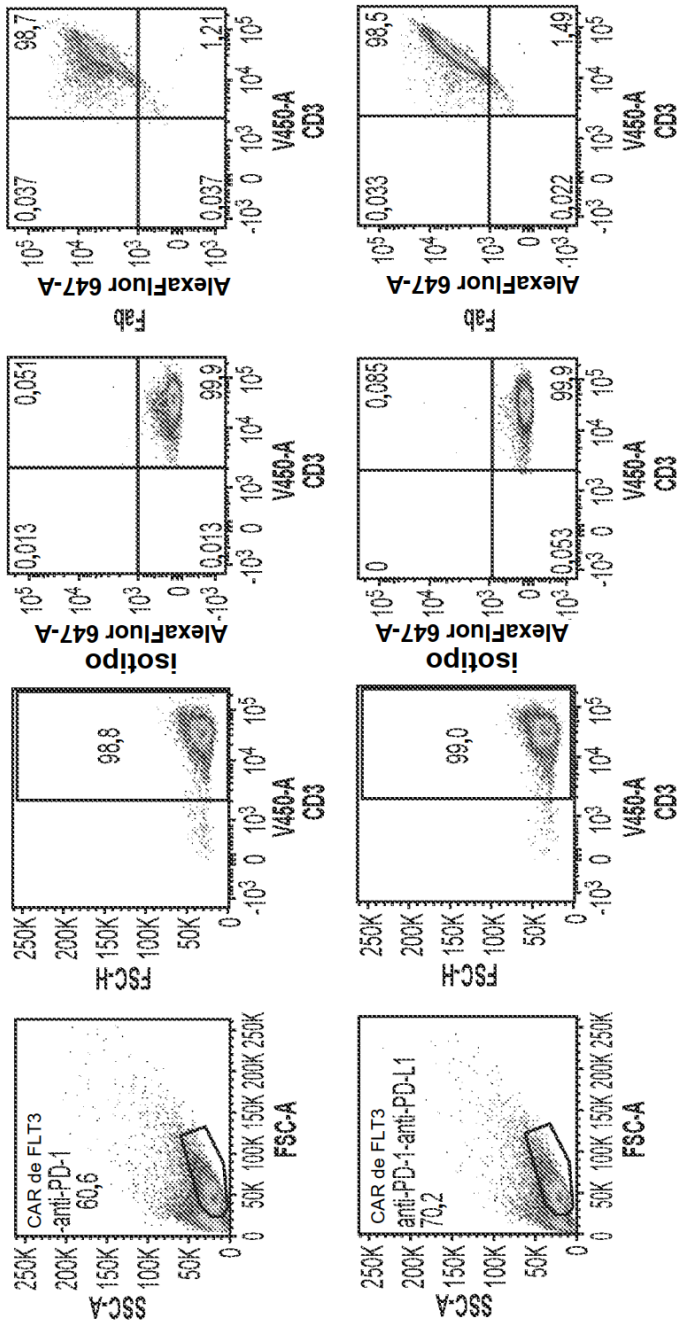
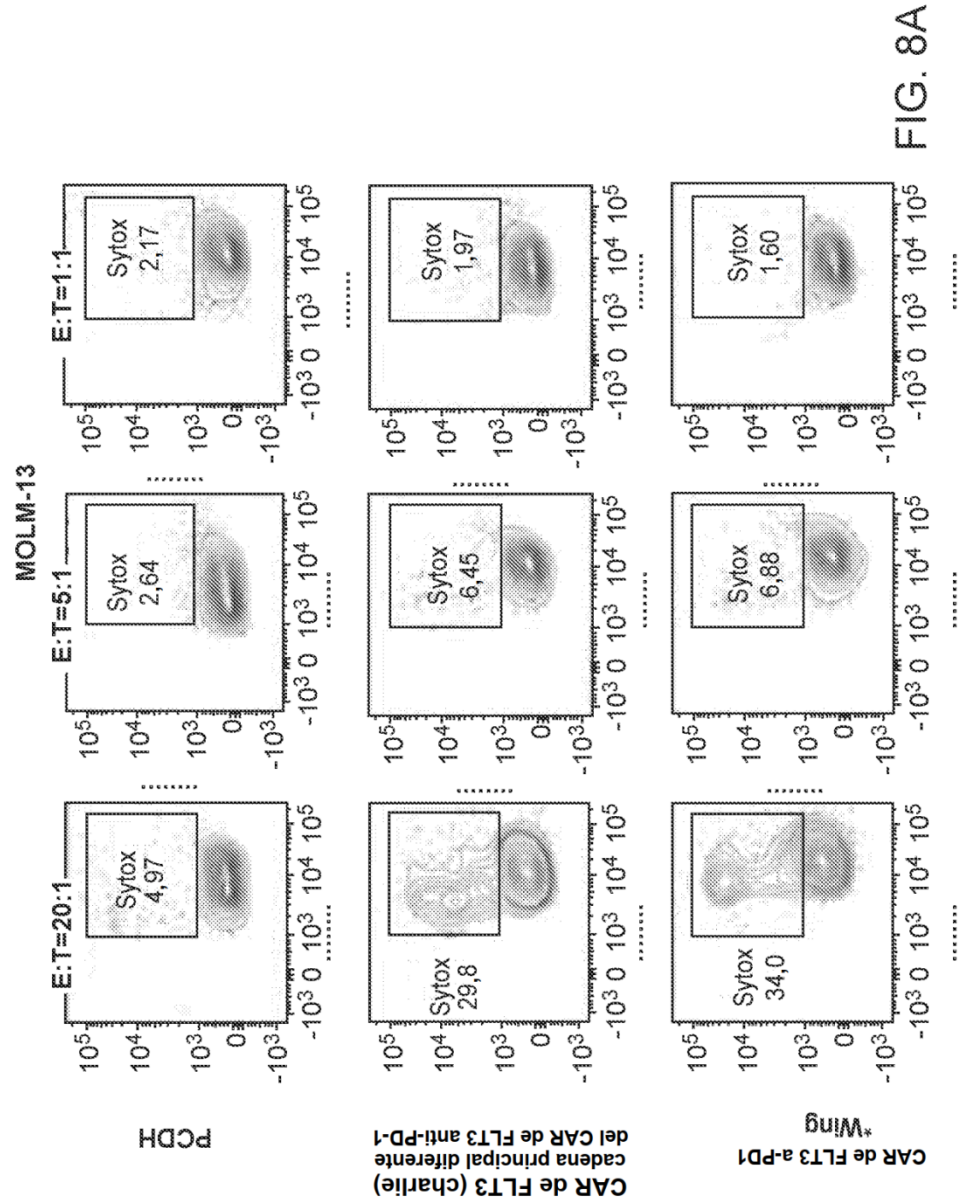


FIG. 7 (Cont.)



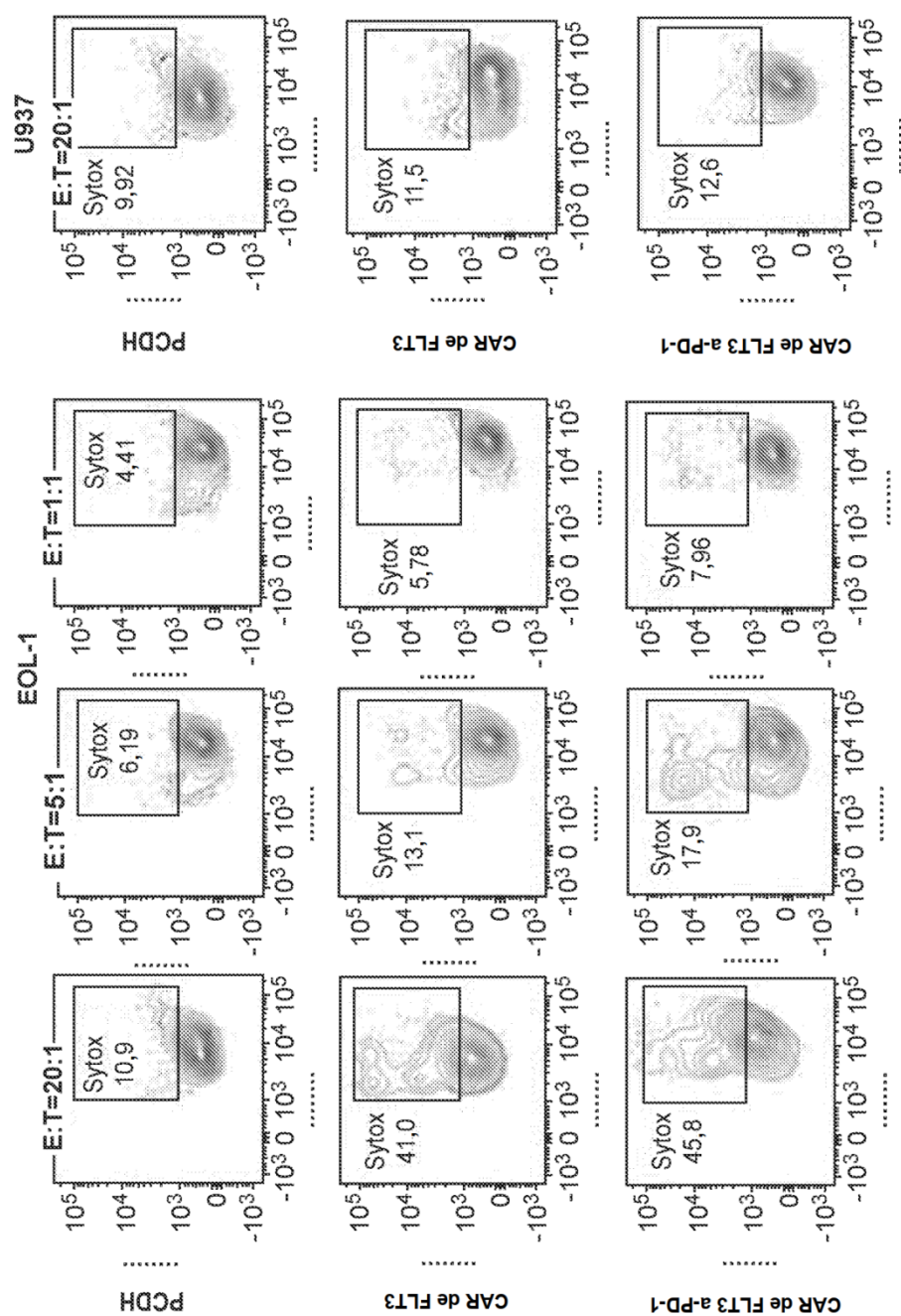


FIG. 8A (Cont.)

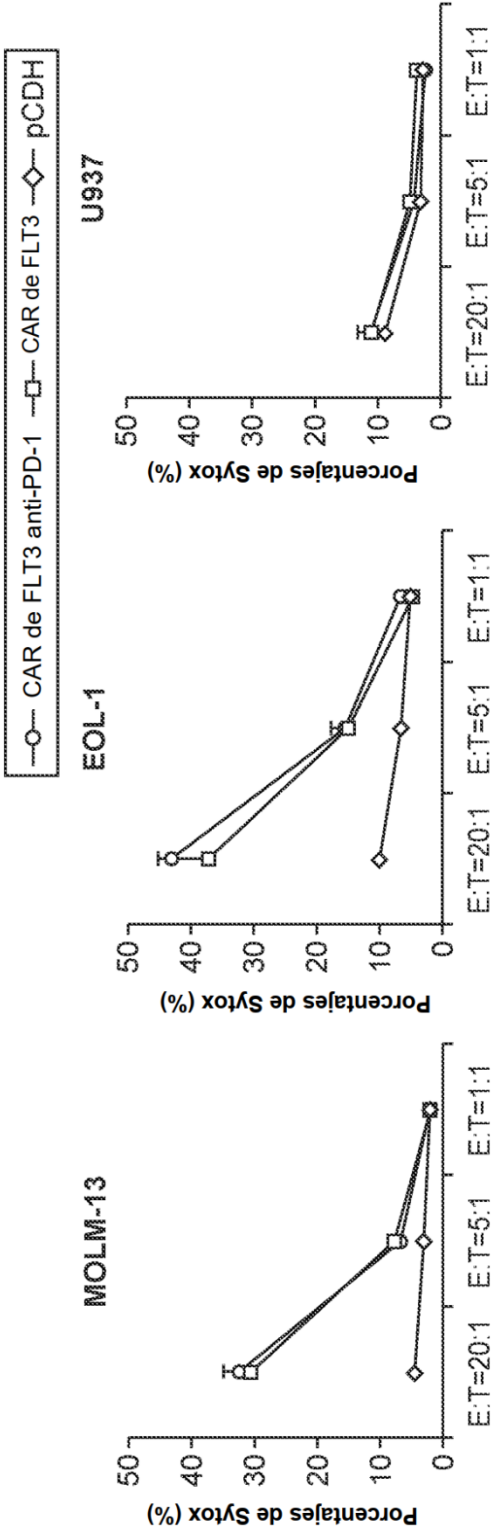
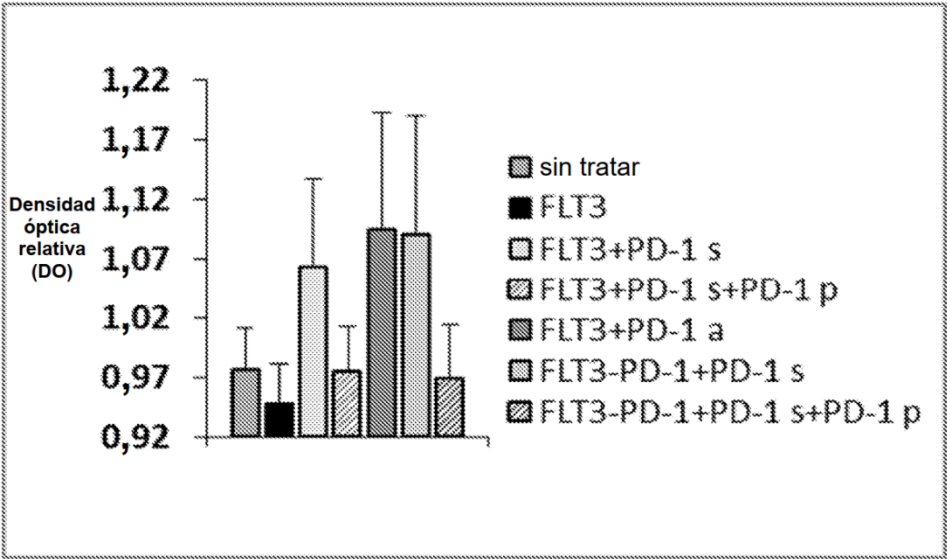


FIG. 8B



sin tratar FLT3 FLT3+PD-1 s
FLT3+PD-1 s+PD-1 p FLT3+PD-1 a FLT3-PD-1+PD-1 s+PD-1 p

FIG. 9

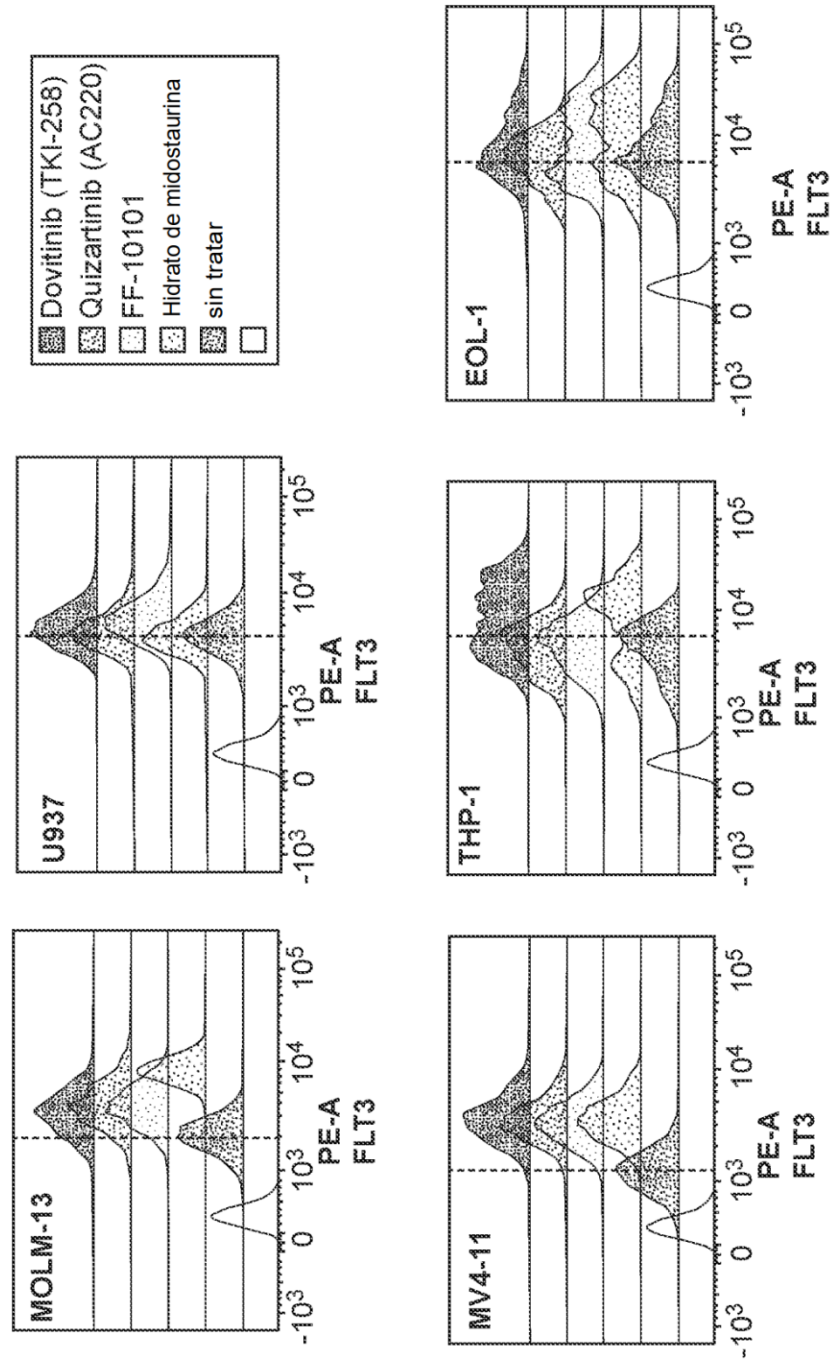


FIG. 10

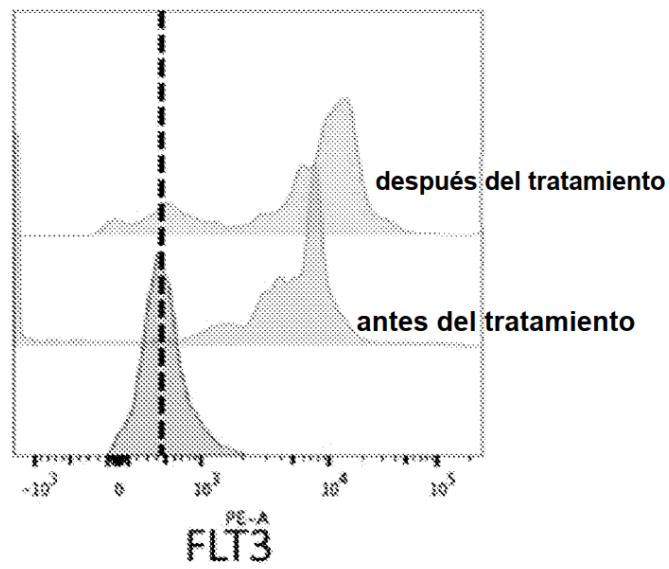


FIG. 11

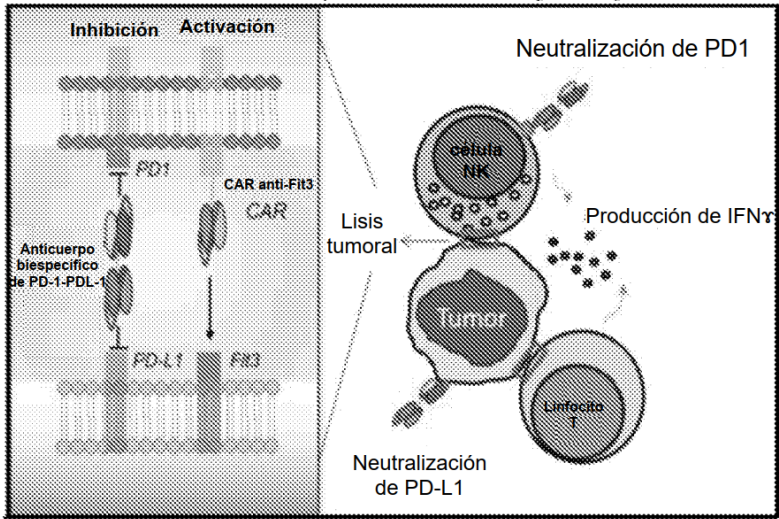


FIG. 12