

COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE TERAPIA CELULAR PARA MODULAR LA SEÑALIZACIÓN DEL TGF-B

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 **[0001]** Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 63/149,628, presentada el 15 de febrero de 2021, y la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 63/306,836, presentada el 04 de febrero de 2022, la descripción de cada una de las cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

10 ANTECEDENTES

- [0002]** La inmunoterapia que usa células manipuladas por ingeniería genética que se dirigen a antígenos específicos de cáncer ha demostrado eficacia en el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Sin embargo, las células malignas se adaptan para generar un microambiente inmunosupresor para protegerse del reconocimiento y la eliminación inmunitaria. Los altos
- 15 niveles de TGF β en el microambiente tumoral pueden contribuir al mantenimiento y progresión de algunos tipos de células cancerígenas. El microambiente tumoral plantea importantes desafíos a los métodos de tratamiento que implican la estimulación de una respuesta inmunitaria, tal como en el caso de las terapias celulares dirigidas. En consecuencia, son deseables estrategias terapéuticas novedosas para tratar cánceres.

20 SUMARIO

- [0003]** La presente invención proporciona, entre otras cosas, un sistema novedoso para modular la señalización del TGF β para su uso en el tratamiento de cánceres (por ejemplo, tumores sólidos). La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que modular la señalización del factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β) puede mejorar
- 25 los métodos de terapia celular adoptiva, tales como las terapias con receptores de antígenos quiméricos (CAR) manipulados por ingeniería genética dirigida. Modular la señalización del TGF- β , tal como la efectuada por el sistema de anticuerpos (por ejemplo, anti-TGF β o anti-TGF β R), fragmentos de unión a antígeno o dominio extracelular recombinante del TGF- β R2, descrito en la presente descripción, alivia el microambiente inmunosupresor en tumores y
- 30 potencia la eficacia de la inmunoterapia.

[0004] La inmunoterapia basada en linfocitos T se ha convertido en una nueva frontera en la biología sintética; se prevé que múltiples promotores y productos génicos dirijan estas

células altamente potentes al microambiente tumoral, donde los linfocitos T pueden evadir señales reguladoras negativas y mediar la destrucción efectiva del tumor. La eliminación de los linfocitos T no deseados a través de la dimerización inducida por el fármaco de construcciones de caspasa 9 inducible con AP1903 demuestra una manera en la que un interruptor potente que puede controlar las poblaciones de linfocitos T puede iniciarse farmacológicamente (Di Stasi A y otros, N Engl J Med. 2011; 365(18): 1673-83). Por lo tanto, si bien parece que los CAR pueden desencadenar la activación de los linfocitos T de manera similar a un receptor endógeno de linfocitos T, un impedimento importante para la aplicación clínica de esta tecnología hasta la fecha ha sido la expansión *in vivo* de linfocitos T CAR+, la rápida desaparición de las células después de la infusión y la decepcionante actividad clínica. En consecuencia, existe una necesidad urgente en la técnica para descubrir composiciones y métodos novedosos para el tratamiento del cáncer mediante el uso de un enfoque que pueda exhibir un efecto antitumoral específico y efectiva sin los efectos no deseados (por ejemplo, alta toxicidad, eficacia insuficiente).

[0005] La presente invención aborda estas necesidades al proporcionar un sistema de modulación inmunitaria que comprende un CAR y un modulador de la ruta de señalización del TGF β expresado en una célula inmunitaria (por ejemplo, un linfocito T). Las composiciones y los métodos terapéuticos que comprenden el sistema de modulación inmunitaria pueden usarse para tratar cánceres y otras enfermedades y/o afecciones. En particular, la presente invención proporciona células inmunitarias manipuladas por ingeniería genética que expresan CAR blindados que pueden usarse para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión desregulada del TGF β (por ejemplo, cánceres, tumores sólidos). Los linfocitos T con CAR blindados que coexpresan un modulador del TGF β exhiben una alta expresión superficial del CAR en los linfocitos T transducidos y una citólisis potenciada de las células cancerígenas. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos y composiciones para potenciar la respuesta inmunitaria frente a cánceres y patógenos mediante el uso de un sistema de modulación inmunitaria (por ejemplo, linfocitos T CAR manipulados por ingeniería genética) que comprende un polipéptido que modula la señalización del TGF-b.

[0006] La presente invención proporciona, en parte, polipéptidos CAR mejorados que comprenden un modulador de la ruta de señalización del TGF β , moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos, células (por ejemplo, linfocitos T) modificadas

genéticamente para expresar los CAR mejorados y métodos para usar las células modificadas en terapia celular adoptiva para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cánceres de tumores sólidos).

5 **[0007]** En algunas modalidades, la presente invención proporciona linfocitos T CAR que se han modificado para expresar un modulador de la ruta de señalización del TGF β (también denominado en la presente descripción como “linfocitos T CAR blindadas del TGF β ”), de manera que las células, cuando se administran a un sujeto que lo necesite, son capaces de provocar una respuesta inmunitaria en el sujeto que, en relación con un linfocito T CAR que no expresa un modulador de la ruta de señalización del TGF β (también denominada en la
10 presente descripción como “linfocito T CAR no blindado”).

[0008] En algunos aspectos, la presente invención proporciona células inmunosensibles (por ejemplo, linfocitos T) que portan receptores de antígenos, que pueden ser receptores de antígenos quiméricos (CAR), que incluyen polipéptidos que modulan la señalización del TGF-b. Estas células inmunorrespuestas manipuladas por ingeniería genética (por ejemplo,
15 linfocitos T CAR) están dirigidas a antígenos y resisten la inmunosupresión y/o tienen propiedades inmunoactivadoras mejoradas.

[0009] En un aspecto, la presente invención proporciona una población de linfocitos T manipulados por ingeniería genética, que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce un antígeno asociado al cáncer y un modulador de la ruta de
20 señalización del TGF β .

[0010] En algunas modalidades, la población de células comprende un CAR que reconoce un antígeno seleccionado del grupo que consiste en ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, un antígeno celular infectado por citomegalovirus (CMV), CEACAM
25 5, Claudin 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, acetilcolina fetal receptor, receptor de folato-a, GCC (también conocido como GUCY2C), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, cadena ligera x, KDR, LeY, molécula de adhesión celular LI, MAGE-AI, MUC1, MUC13, mesotelina, ligandos NKG2D, NY-ES0-1, antígeno oncofetal (h5T4), PSCA, PSMA, PTK7, ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2 y WT-1.

30 **[0011]** En algunas modalidades, la población de células comprende un CAR de CD19 o un CAR de GCC.

[0012] En algunas modalidades, la población de células comprende un modulador de la ruta

de señalización del TGF β que se une al TGF β o a un receptor del TGF β .

[0013] En algunas modalidades, la población de células comprende un modulador de la ruta de señalización del TGF β que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la Tabla 1.

5 **[0014]** En algunas modalidades, la población de células es autóloga.

[0015] En algunas modalidades, la población de células es alogénica.

[0016] En algunas modalidades, la población de células son células primarias. En algunas modalidades, la población de células se deriva de células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

10 **[0017]** En algunas modalidades, la población de células se modifica genéticamente mediante el uso de un vector que comprende un primer ácido nucleico que codifica un polipéptido CAR y un segundo ácido nucleico que codifica un modulador de la ruta de señalización del TGF β .

[0018] En algunas modalidades, la población de células se modifica genéticamente
15 mediante el uso de dos vectores, un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido CAR y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica un modulador de la ruta de señalización del TGF β .

[0019] En algunas modalidades, la población de células se modifica genéticamente mediante el uso de Crispr. En algunas modalidades, la población de células se modifica
20 genéticamente mediante el uso de transducción retroviral (que incluye g-retroviral), transducción lentiviral, transposones y transposasas (sistemas Sleeping Beauty y PiggyBac), expresión de genes mediada por transferencia de ARN mensajero, edición de genes (inserción de genes o transposición de genes delección/disrupción), CRISPR-Cas9, ZFN (nucleasa de dedo de zinc) o TALEN (activador de transcripción como nucleasa
25 efectora).

[0020] En algunas modalidades, la población de células comprende un CAR que comprende un dominio de señalización intracelular seleccionado del grupo que consiste en la cadena CD3 ζ , CD97, 2B4, GDI Ia-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, dominio de señalización de CD28, o sus combinaciones y variaciones.

30 **[0021]** En algunas modalidades, la población de células comprende un CAR que comprende un dominio transmembrana derivado de un dominio transmembrana seleccionado del grupo que consiste en CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 o sus

combinaciones.

[0022] En un aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende un primer ácido nucleico que codifica un polipéptido CAR y un segundo ácido nucleico que codifica un modulador de la ruta de señalización del TGF β .

5 **[0023]** En algunas modalidades, el vector que comprende un primer ácido nucleico que codifica un polipéptido CAR y un segundo ácido nucleico que codifica un modulador de la ruta de señalización del TGF β comprende un sitio de entrada ribosomal interno.

[0024] En algunas modalidades, el vector comprende además una secuencia de ribosoma 2A.

10 **[0025]** En un aspecto, la presente invención proporciona una célula inmunitaria modificada con un vector que comprende un primer ácido nucleico que codifica un polipéptido CAR y un segundo ácido nucleico que codifica un modulador de la ruta de señalización del TGF β .

[0026] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es un linfocito T.

[0027] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para modular una
15 respuesta inmunitaria en un hospedero, donde el método comprende administrar al hospedero una población de linfocitos T manipulados por ingeniería genética, que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce un antígeno asociado con el cáncer y un modulador de la ruta de señalización del TGF β , en donde la modulación de la respuesta inmunitaria comprende uno o más de los siguientes por parte de las células
20 inmunitarias del hospedero: aumento en la producción de IFN γ ; aumento en la producción de IL-2; aumento en la presentación de antígenos; y aumento de la proliferación.

[0028] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una población de linfocitos T manipulados por ingeniería genética, que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce un antígeno asociado
25 al cáncer y un modulador de la ruta de señalización del TGF β .

[0029] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende en administrar al sujeto una cantidad efectiva de una población de linfocitos T manipulados por ingeniería genética, que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce un
30 antígeno asociado al cáncer y un modulador de la ruta de señalización del TGF β .

[0030] En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia

mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, policitemia vera, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadenas pesadas, tumores sólidos, sarcoma, carcinoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma del conducto del nílolo, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de células pequeñas carcinoma de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma colorrectal, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis de estos.

[0031] En un aspecto, la presente invención proporciona un sistema inmunomodulador que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR); y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que modula la señalización del TGF- β (por ejemplo, modulador de señalización del TGF β).

[0032] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF- β comprende una cadena pesada variable (vH).

[0033] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF- β comprende una cadena pesada variable (vH) y una cadena ligera variable (vL).

[0034] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF- β comprende una molécula de unión a antígeno seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo de IgA, anticuerpo de IgG, anticuerpo de IgE, anticuerpo de IgM, anticuerpo bi o multiespecífico, fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')₂, fragmento Fd', fragmento Fd, CDR aisladas o conjuntos de estas; fragmento variable monocatenario (scFv),

fusión polipéptido-Fc, anticuerpo de un solo dominio (sdAb), anticuerpo de camélidos; anticuerpo enmascarado, productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (“SMIPs™”), monocatenario, diacuerpo en tándem, VHH, anticalina, nanocuerpo, humacuerpo, minicuerpos, BiTE, proteína de repetición de anquirina, DARPIN, Avimer, DART, anticuerpo tipo TCR, adnectina, afillina, transcuerpo; Affibody, TrimerX, MicroProtein, finómero, centirina; y KALBITOR o sus fragmentos.

[0035] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b comprende un fragmento variable monocatenario (scFv). En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b comprende un anticuerpo de dominio único (sdAb). En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b comprende un anticuerpo solo de cadena pesada.

[0036] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la Tabla 1.

[0037] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b comprende un agente de unión a antígeno dimérico.

[0038] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b se une a TGF-b.

[0039] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b se une a un receptor del TGF-b.

[0040] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b se une al receptor 2 del TGF-b (TGF-bR2).

[0041] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b comprende el receptor 2 del TGF-b (TGF-bR2) o un fragmento de este.

[0042] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b comprende un dominio extracelular del TGF-bR2 (TGF-bR2).

[0043] En algunas modalidades, el CAR se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, un antígeno celular infectado por citomegalovirus (CMV), CEACAM 5, Claudin 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, acetilcolina fetal receptor, receptor de folato-a, GCC (también conocido como GUCY2C), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, cadena ligera x, KDR, LeY, molécula de adhesión celular LI, MAGE-AI, MUC1, MUC13, mesotelina, ligandos NKG2D,

NY-ES0-1, antígeno oncofetal (h5T4), PSCA, PSMA, PTK7, ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2 y WT-1.

[0044] En algunas modalidades, el CAR se une a CD19 o GCC.

[0045] En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio de señalización intracelular seleccionado del grupo que consiste en la cadena CD3 ζ , CD97, 2B4, GDI la-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, dominio de señalización de CD28, o sus combinaciones y variaciones.

[0046] El sistema inmunomodulador de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el CAR comprende un dominio transmembrana derivado de un dominio transmembrana seleccionado del grupo que consiste en CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 o sus combinaciones.

[0047] En determinadas modalidades, el polipéptido CD3 ζ modificado carece de la totalidad o parte de los motivos de activación basados en tirosina del inmunorreceptor (ITAM), en los que los ITAM son ITAM1, ITAM2 e ITAM3. En determinadas modalidades, el polipéptido CD3 ζ modificado carece además de la totalidad o parte de las regiones de extensión ricas en elementos básicos (BRS), en las que las regiones BRS son BRS1, BRS2 y BRS3.

[0048] En un aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende el sistema inmunomodulador descrito en la presente descripción, en donde la secuencia que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR); y la secuencia que codifica un polipéptido que modula la señalización del TGF- β están presentes en una sola construcción.

[0049] En algunas modalidades, la secuencia que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR); y la secuencia que codifica un polipéptido que modula la señalización del TGF- β están presentes en construcciones diferentes.

[0050] En un aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico que codifica el sistema inmunomodulador descrito en la presente descripción.

[0051] En algunas modalidades, el vector comprende un Sitio de Entrada Ribosomal Interno (IRES).

[0052] En algunas modalidades, el vector comprende una secuencia de ribosomas 2A. En algunas modalidades, la secuencia de ribosomas 2A es P2A o T2A.

[0053] En un aspecto, la presente invención proporciona una célula inmunosensible que comprende el sistema inmunomodulador descrito en la presente descripción.

[0054] En un aspecto, la presente invención proporciona una célula inmunosensible que

comprende: un agente de dirección con especificidad para un antígeno asociado a un tumor o un ligando de estrés y un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF-b.

[0055] En algunas modalidades, el agente de dirección se une específicamente a un ligando de estrés seleccionado del grupo que consiste en MIC-A, MIC-B, ULBP1-6;

[0056] En un aspecto, la presente invención proporciona una célula inmunosensible que comprende: un receptor de antígeno quimérico (CAR); y un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF-b.

[0057] En algunas modalidades, el CAR y el ácido nucleico que codifica un polipéptido que modula la señalización del TGF-b se proporcionan en el mismo polinucleótido.

[0058] En algunas modalidades, el CAR y el ácido nucleico que codifica un polipéptido que modula la señalización del TGF-b se proporcionan en polinucleótidos separados.

[0059] En algunas modalidades, el polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF-b es secretado por la célula.

[0060] En algunas modalidades, el polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF-b comprende una cadena pesada variable (vH).

[0061] En algunas modalidades, el polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF-b comprende una cadena pesada variable (vH) y una cadena ligera variable (vL).

[0062] En algunas modalidades, el polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF-b comprende un fragmento variable monocatenario (scFv).

[0063] En algunas modalidades, el polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF-b comprende un agente de unión a antígeno dimérico.

[0064] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b se une a TGF-b.

[0065] En algunas modalidades, el polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF-b comprende el receptor 2 del TGF-b (TGF-bR2) o un fragmento de este.

[0066] En algunas modalidades, el polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF-b comprende un dominio extracelular del TGF-bR2.

[0067] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b se une a un receptor del TGF-b.

[0068] En algunas modalidades, el polipéptido que modula la señalización del TGF-b se une al receptor 2 del TGF-b (TGF-bR2).

[0069] En algunas modalidades, la célula inmunosensible comprende un CAR expresado a partir de un vector, un ARNm diseñado o integrado en el cromosoma de la célula hospedera. En algunas modalidades, la secuencia que codifica CAR se integra en el cromosoma de la célula hospedera mediante el uso de una endonucleasa. En algunas modalidades, la

5 secuencia que codifica CAR se integra en el cromosoma de la célula hospedera mediante el uso de Crispr/Cas9, Cas12a o Cas13.

[0070] En algunas modalidades, la célula inmunosensible comprende un polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF- β y se expresa a partir de un vector, un ARNm diseñado o integrado en el cromosoma de la célula hospedera. En algunas

10 modalidades, la secuencia que codifica el polipéptido que modula la señalización del TGF- β se integra en el cromosoma de la célula hospedera mediante el uso de Crispr/Cas9, Cas12a o Cas13.

[0071] En algunas modalidades, la célula inmunosensible se selecciona del grupo que consiste en un linfocito T, una célula asesina natural (NK), un linfocito T asesino natural (NK), un linfocito T gamma delta, un linfocito T citotóxico (CTL), un linfocito T regulador, una

15 célula madre embrionaria humana, un linfocito B, un macrófago y una célula madre pluripotente a partir de la cual pueden diferenciarse las células linfoides (por ejemplo, una célula NK o T derivada de una iPSC).

[0072] En algunas modalidades, la célula inmunosensible es una célula autóloga manipulada por ingeniería genética. En algunas modalidades, la célula inmunosensible es

20 una célula alogénica manipulada por ingeniería genética.

[0073] En algunas modalidades, la célula inmunosensible comprende un CAR que se une a un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, un antígeno celular infectado por citomegalovirus (CMV), CEACAM 5, Claudin, 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, receptor de folato- α , GCC (también conocido como GUCY2C), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R- α 2, cadena ligera x, KDR, LeY, molécula de adhesión celular LI, MAGE-AI, MUC1, MUC13, mesotelina, ligandos NKG2D, NY-ES0-1, antígeno oncofetal

25 (h5T4), PSCA, PSMA, PTK7, ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2 y WT-1.

[0074] En algunas modalidades, el CAR se une a CD19 o GCC. En algunas modalidades, el CAR se une a GCC.

30

[0075] En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio de señalización intracelular derivado del dominio de señalización CD3ζ, CD97, 2B4, GDI la-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, CD28, o sus combinaciones y variaciones.

5 **[0076]** En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio transmembrana derivado de un dominio transmembrana seleccionado del grupo que consiste en CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 o sus combinaciones.

[0077] En determinadas modalidades, el polipéptido CD3z modificado carece de la totalidad o parte de los motivos de activación basados en tirosina del inmunorreceptor (ITAM), en los que los ITAM son ITAM1, ITAM2 e ITAM3. En determinadas modalidades, el polipéptido
10 CD3z modificado carece además de la totalidad o parte de las regiones de extensión ricas en elementos básicos (BRS), en las que las regiones BRS son BRS1, BRS2 y BRS3.

[0078] En algunas modalidades, la célula inmunosensible comprende un receptor coestimulador quimérico (CCR). En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio coestimulador. En algunas modalidades, el CAR no comprende un dominio de señalización
15 intracelular. En algunas modalidades, el CAR no comprende un dominio CD3z.

[0079] En algunas modalidades, el polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF- β mejora una respuesta inmunitaria de la célula inmunosensible.

[0080] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del sistema inmunomodulador descrito en la presente
20 descripción.

[0081] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de la secuencia de ácido nucleico que codifica el sistema inmunomodulador descrito en la presente descripción.

[0082] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que
25 comprende una cantidad efectiva del vector que codifica el sistema inmunomodulador descrito en la presente descripción.

[0083] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de la célula inmunosensible descrita en la presente descripción.

30 **[0084]** En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0085] En un aspecto, la presente invención proporciona un kit para tratar un cáncer, en

donde el kit comprende una célula inmunosensible que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR); y un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF- β .

[0086] En algunas modalidades, el kit comprende el ácido nucleico o el vector que codifica el sistema inmunomodulador descrito en la presente descripción.

[0087] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer o la metástasis del mismo en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad efectiva de una célula inmunosensible que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR); y un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF- β .

[0088] En algunas modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción pueden usarse para tratar un cáncer hematopoyético. En otras modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción pueden usarse para tratar un cáncer de tumor sólido.

[0089] En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, policitemia vera, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadenas pesadas, tumores sólidos, sarcoma, carcinoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma del conducto del nilo, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de células pequeñas carcinoma de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma colorrectal, carcinoma

epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

5 **[0090]** En algunas modalidades, el método comprende además administrar un segundo agente terapéutico al sujeto.

[0091] En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico se administra sistémicamente al sujeto.

10 **[0092]** En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico se administra por separado del CAR y el ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF- β

[0093] En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico se dirige a PD1/PD-L1, CXCR2 y/o IL-15.

[0094] En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de PD1/PD-L1.

15 **[0095]** En un aspecto, la presente invención proporciona un método para modular la actividad de una célula inmunitaria, en donde el método comprende administrar un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR); y un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF- β .

20 **[0096]** En un aspecto, la presente invención proporciona un método para modular la actividad de un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el método comprende administrar un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR); y un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF- β .

25 **[0097]** En un aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir la carga tumoral en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad efectiva del sistema inmunomodulador que comprende el ácido nucleico, el vector o la célula inmunosensible descrito en la presente descripción.

30 **[0098]** En algunas modalidades, el método reduce el número de células tumorales. En algunas modalidades, el método reduce el tamaño del tumor. En algunas modalidades, el método erradica el tumor en el sujeto.

[0099] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la producción de citocinas inmunoactivadoras en respuesta a una célula cancerígena en un

sujeto, que comprende administrar al sujeto el sistema inmunomodulador que comprende el ácido nucleico, el vector o la célula inmunorresponsiva descrito en la presente descripción.

[0100] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula inmunosensible específica de antígeno, en donde el método comprende introducir en la célula inmunosensible una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR); y un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante que modula la señalización del TGF- β .

[0101] Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada que sigue son solamente ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de la invención, tal como se reivindicará.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0102] El dibujo incluido en la presente descripción, compuesto por las figuras que siguen, tiene solo fines ilustrativos y no taxativos.

[0103] La **Figura 1A-1E** demuestra la expresión ilustrativa de moduladores de señalización del CAR y TGF- β en células inmunosensibles (por ejemplo, linfocitos T transducidas). La **Figura 1A** ilustra la población de linfocitos, la **Figura 1B** ilustra singletes, la **Figura 1C** representa poblaciones de células CD3+ vivas y la **Figura 1D** muestra resultados de citometría de flujo ilustrativos que evalúan la expresión del CAR en linfocitos T CAR humanos blindados que expresan el TGF- β . La **Figura 1E** representa un gráfico de barras que muestra las eficiencias de transducción como % de células vivas positivas para la tinción con el CAR mediante el uso de células sin blindaje transducidas con un CAR de CD19 solo, y linfocitos T CAR de CD19 blindados con TGF β scFv VH-VL1 (SEQ ID NO: 1), TGF β scFv VH-VL2 (SEQ ID NO: 2), TGF β scFv VL-VH (SEQ ID NO: 3), TGF β R2 scFv VH-VL (SEQ ID NO: 4), TGF β R2 scFv VL-VH (SEQ ID NO: 5), mTGF β R2 VH1 (SEQ ID NO: 6) y hTGF β R2 VH1 (SEQ ID NO: 8) o células no transducidas.

[0104] La **Figura 2A-2B** son gráficos que demuestran resultados ilustrativos del ensayo *in vitro* de destrucción de células inmunorreceptivas que coexpresan un CAR anti-CD19 y un modulador de señalización del TGF- β contra células Raji CD19+ (Figura 2A) y células Raji CD19ko (Figura 2B) mediante el uso de un efector relativo al objetivo de células no protegidas transducidas con un CAR de CD19 solo y linfocitos T CAR de CD19 blindados con TGF β scFv VH-VL1 (SEQ ID NO: 1), TGF β scFv VH-VL2 (SEQ ID NO: 2), TGF β scFv

VL-VH (SEQ ID NO: 3) , TGFbR2 scFv VH-VL (SEQ ID NO: 4), TGFbR2 scFv VL-VH (SEQ ID NO: 5), mTGFbR2 VH1 (SEQ ID NO: 6) y hTGFbR2 VH1 (SEQ ID NO: 8) o células no transducidas.

[0105] La **Figura 3A** representa un gráfico de barras que muestra resultados ELISA ilustrativos que demuestran la secreción de aglutinantes del TGF- β y la **Figura 3B** representa un gráfico de barras que representa resultados ELISA ilustrativos que demuestran la secreción de aglutinantes del TGF β R2 por linfocitos T CAR humanos y su capacidad para unirse a su antígeno afín.

[0106] La **Figura 4** representa un gráfico de barras que representa resultados ilustrativos de un ensayo de luciferasa que evalúa la inhibición de la señalización del TGF- β por sobrenadante de linfocitos T CAR que secretan construcciones TGFb scFv VH-VL1 (SEQ ID NO: 1), TGFb scFv VH-VL2 (SEQ ID NO: 2), TGFb scFv VL-VH (SEQ ID NO: 3), TGFbR2 scFv VH-VL (SEQ ID NO: 4), TGFbR2 scFv VL-VH (SEQ ID NO: 5), mTGFbR2 VH1 (SEQ ID NO: 6) y hTGFbR2 VH1 (SEQ ID NO: 8).

[0107] La **Figura 5A** muestra un gráfico de barras que representa resultados ilustrativos de un ensayo de luciferasa que evalúa la inhibición de la señalización del TGF- β por sobrenadante de linfocitos T CAR que secretan el dímero TGFb-scFv VH-VL1 G4S (SEQ ID NO: 17), dímero TGFb-scFv VH-VL1 2xG4S (SEQ ID NO: 18) minicuerpo TGFb-scFv VH-VL1 (SEQ ID NO: 21), minicuerpo TGFb-scFv VH-VL1 + bisagra (SEQ ID NO: 19). La **Figura 5B** muestra un esquema de moduladores del TGF- β ilustrativos diseñados y examinados mediante el uso de un ensayo indicador de luciferasa para la secreción de aglutinantes multiméricos contra TGF- β . La **Figura 5C** muestra un esquema de moduladores del TGF- β ilustrativos que comprenden dominios de unión a VHH.

[0108] La **Figura 6A** muestra un gráfico de barras que representa los resultados ilustrativos del ensayo de luciferasa que evalúa la actividad de bloqueo relativa de los linfocitos T con CAR blindados que coexpresan aglutinantes del dímero TGFb-scFv VH-VL1 monomérico (SEQ ID NO: 1) y TGFb-scFv VH-VL1 G4S dimérico (SEQ ID NO: 17) en comparación con células no blindadas que expresan un CAR solo. La **Figura 6B** muestra un gráfico de barras que representa resultados ilustrativos de un ensayo de luciferasa usado para evaluar la actividad relativa de bloqueo de construcciones de monómeros y dímeros TGF β R2 VHH y scFv. Linfocitos T CAR no blindados, monómero mTGFbR2 VH2, dímero mTGFbR2 VH2 G4S, trímero mTGFbR2 VH2 G4S, monómero hTGFbR2 VH2, dímero hTGFbR2 VH2 G4S,

monómero hTGFbR2 VH3, dímero hTGFbR2 VH3 G4S, monómero hTGFbR2 scFv VH-VL, dímero hsTGFbR2 scFv VH-VL G4S.

[0109] La Figura 7A y la Figura 7B representan gráficos de barras que representan resultados de ELISA ilustrativos que demuestran que los moduladores del TGFb ilustrativos se unen a TGFbR2 humano (Figura 7A) pero no a TGFbR2 de ratón (Figura 7B). Linfocitos T CAR no blindados, monómero mTGFbR2 VH2, dímero mTGFbR2 VH2 G4S, trímero mTGFbR2 VH2 G4S, monómero hTGFbR2 VH2, dímero hTGFbR2 VH2 G4S, monómero hTGFbR2 VH3, dímero hTGFbR2 VH3 G4S, monómero hTGFbR2 scFv VH-VL, dímero hsTGFbR2 scFv VH-VL G4S

[0110] La Figura 8A muestra un cronograma de inyección ilustrativo para evaluar el crecimiento tumoral de células tumorales EMT6-hCD19-Fluc como se describe en el Ejemplo 6. La **Figura 8B** muestra un volumen tumoral ilustrativo a lo largo del tiempo en ratones que recibieron linfocitos T CAR que secretan un aglutinante del TGF- β en relación con los linfocitos T CAR no blindados o los linfocitos T CAR no transducidos. La **Figura 8C** demuestra una metástasis hepática ilustrativa en ratones tratados con linfocitos T CAR que secretan aglutinantes del TGF- β en relación con los linfocitos T CAR no blindados o no transducidos. La **Figura 8D** demuestra una metástasis pulmonar ilustrativa en ratones tratados con linfocitos T CAR que secretan aglutinantes del TGF- β en relación con los linfocitos T CAR no blindados o no transducidos. La **Figura 8E** demuestra resultados de imagen ilustrativos de células tumorales que expresan luciferasa en tejidos hepáticos y pulmonares.

[0111] La Figura 9A y la Figura 9B representan gráficos de barras que representan resultados ilustrativos de un ensayo informador SBE-Luc TGF-b que compara el sobrenadante de T CAR de ratón acorazado que secreta diferentes trampas de ligandos del TGF-b (monómeros TGF-b scFv VH-VL1 a TGFbR2 ECD, homodímeros (Figura 9A) y heterodímeros (Figura 9B)) a linfocitos T CAR no protegidos.

[0112] La Figura 10A muestra una línea de tiempo de inyección ilustrativa para evaluar el crecimiento tumoral de células tumorales EMT6-hCD19-Fluc. La **Figura 10B** muestra un volumen tumoral ilustrativo a lo largo del tiempo en ratones que recibieron linfocitos T no transducidos o linfocitos T CAR no blindados (linfocitos T CAR que no coexpresan un modulador de señalización del TGF β). La **Figura 10C** muestra un volumen tumoral ilustrativo a lo largo del tiempo en ratones que recibieron linfocitos T CAR blindados que

coexpresan el dímero TGFbR1+2ECD o linfocitos T CAR no blindados (linfocitos T CAR que no coexpresan un modulador de señalización del TGFβ). **La Figura 10D** muestra un volumen tumoral ilustrativo a lo largo del tiempo en ratones que recibieron anticuerpos anti-TGFb sistémicos (1D11) o linfocitos T CAR no blindados (linfocitos T CAR que no coexpresan un modulador de señalización del TGFβ).

[0113] La Figura 11 representa un gráfico que demuestra un volumen tumoral ilustrativo en ratones desarrollados a partir de células MC38 que expresan CD19 a lo largo del tiempo. Los ratones recibieron linfocitos T no transducidos, linfocitos T CAR antiCD19 no blindados o linfocitos T CAR que secretan un aglutinante inhibidor contra TGF-b (TGF-b scFv VH-VL1).

[0114] La Figura 12 representa un gráfico que muestra un análisis de secuencia de ARN ilustrativo que demuestra una activación mejorada de la respuesta inmunitaria del hospedero por parte de los linfocitos T CAR que secretan un aglutinante contra TGF-b (TGF-b scFv VH-VL1 (SEQ ID NO: 1)).

[0115] La Figura 13 muestra puntajes ilustrativos de biomarcadores para linfocitos T infiltrantes de tumores (CD3d+, CD3e+, CD3g+), linfocitos T CD8+ (CD8a+) y linfocitos T citotóxicos (GzmB+) en tumores de ratones que recibieron TGF-b scFv VH-VL1 (SEQ ID NO: 1) secretora de linfocitos T CAR.

[0116] La Figura 14 muestra un análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA) de muestra única ilustrativo, puntuaciones de enriquecimiento que demuestran un aumento de las firmas de linfocitos T y firmas de IFNg en tumores de ratones que recibieron TGF-b scFv VH-VL1 (SEQ ID NO: 1) que secretan linfocitos T CAR.

[0117] La Figura 15 muestra un análisis de marcador de superficie ilustrativo que incluye TCRa/b, CD8a, CD4, CD25, CD62L, CD11b, Gr1, CD11c, CD45.1 y CD45, en ratones que reciben linfocitos T de control no transducidos, linfocitos T CAR CD19 no blindados o anti-TGF -b scFv VH-VL1 (SEQ ID NO: 1) monómero que secreta linfocitos T CAR.

[0118] La Figura 16A y la Figura 16B son gráficos que representan análisis ilustrativos *in vivo* en un modelo de xenoinjerto GSU que demuestra una función mejorada de los linfocitos T CAR GCC humanos blindados con anticuerpos bloqueadores anti-TGF-b o anti-TGFbR2.

[0119] Las Figuras 17A-17D demuestran concentraciones tumorales y/o plasmáticas de moduladores del TGFb secretados por linfocitos T CAR anti-GCC que coexpresan TGF-b scFv VH-VL1 y TGFbR2 VHH determinadas mediante el uso de un ensayo de LC/MS de

captura inmune anti-Flag.

[0120] Las Figuras 18A-18C son gráficos que representan ensayos ilustrativos de destrucción *in vitro* que dan como resultado células positivas para HT29-GCC mediante el uso de linfocitos T CAR anti-GCC no blindados, linfocitos T CAR anti-GCC blindados con monómero VHH anti-TGFbR2 y linfocitos T CAR anti-GCC blindados con dímero VHH anti-TGFbR2 en ausencia del TGFb (Figura 18A) y en presencia del TGFb (Figura 18B). La Figura 18C muestra la proliferación de linfocitos T CAR en presencia y ausencia del TGFb.

[0121] La Figura 19 representa resultados ilustrativos de citometría de flujo que demuestran la expresión de PD-1/Lag3 en células después de repetir la estimulación con antígeno.

[0122] Las Figuras 20A-20C representan (sc) modelos de xenoinjerto de células que expresan GCC GSU (Figura 20A), HT55 (Figura 20B) y MDA-MB-231-FP4 Luc (Figura 20C) tratadas con linfocitos T CAR blindados y no blindados y linfocitos T CAR que expresan TGFbR2 negativo dominante (dnTGFbR2).

[0123] Las Figuras 21A-21C muestra resultados ilustrativos de un modelo de metástasis hepática HT55 tratado con linfocitos T CAR anti-GCC blindados.

[0124] La Figura 22A muestra los linfocitos T CAR contados por citometría de flujo y el fenotipado FACS realizado en los puntos de tiempo indicados. **La Figura 22B** muestra el porcentaje de citotoxicidad en linfocitos T CAR anti-Msln, que coexpresan un CAR contra Msln junto con un modulador del TGFβ (por ejemplo, TGFβR2-VH o dnTGFbR2) o un VH de control contra GFP (VH de control de Msln).

DEFINICIONES

[0125] Para que la presente invención se entienda más fácilmente, determinados términos se definen primero a continuación. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se exponen a lo largo de la descripción.

[0126] Tal como se usa en la presente y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular “un/a” y “el/la” incluyen las referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a “un método” incluye uno o más métodos y/o etapas del tipo descrito en la presente y/o que serán evidentes para los expertos en la técnica al leer la presente descripción, etc.

[0127] Administrar: Tal como se usa en la presente descripción, “administrar” una composición a un sujeto significa proporcionar, aplicar o poner la composición en contacto con el sujeto. La administración puede lograrse mediante cualquiera de una cantidad de

vías, tales como, por ejemplo, tópica, oral, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intratecal e intradérmica.

[0128] Terapia Celular Adoptiva: Tal como se usan en la presente descripción de manera

intercambiable, los términos "terapia celular adoptiva" o "transferencia celular adoptiva" o

5 "terapia celular" o "ACT" se refieren a la transferencia de células, por ejemplo, una población

de células modificadas genéticamente descritas en la presente descripción, a un paciente

que lo necesite. Las células pueden derivarse y propagarse del paciente que las necesita

(es decir, células autólogas) o podrían haberse obtenido de un donante que no sea del

paciente (es decir, células alogénicas). En algunas modalidades, la célula es una célula

10 inmunitaria, tal como un linfocito, modificada para expresar un CAR y un modulador de la

ruta de señalización del TGF β , como se describe en la presente descripción (por ejemplo,

un linfocito T CAR blindado con TGF β). Pueden usarse varios tipos de células para ACT,

que incluye, pero no se limitan a, células asesinas naturales (NK), linfocitos T, células CD8+,

células CD4+, linfocitos T gamma delta, linfocitos T reguladores, células madre pluripotentes

15 inducidas (iPSC), linfocitos T derivados de iPSC, células NK derivadas de iPSC, células

madre hematopoyéticas (HSC), células madre mesenquimales (MSC) y células

mononucleares de sangre periférica.

[0129] Afinidad: Como se usa en la presente descripción, el término "afinidad" se refiere a

las características de una interacción de unión entre un resto de unión (por ejemplo, un

20 agente de unión a antígeno (por ejemplo, el dominio variable descrito en el presente

descripción) y una diana (por ejemplo, un antígeno (por ejemplo, TGFB o TGFBR) y que

indica la fuerza de la interacción de unión. En algunas modalidades, la medida de afinidad

se expresa como una constante de disociación (K_D). La afinidad de unión de una proteína

de unión a antígeno a su diana puede determinarse mediante métodos de equilibrio (por

25 ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)),

cinética (por ejemplo, análisis BIACORE™) u otros métodos conocidos en la técnica.

[0130] Avidéz: Como se usa en la presente descripción, el término "avidéz" es la suma total

de la fuerza de unión de dos moléculas entre sí en múltiples sitios, por ejemplo, al tener en

cuenta la valencia de la interacción.

30 **[0131] Animal:** Tal como se usa en la presente descripción, el término "animal" se refiere a

cualquier miembro del reino animal. En algunas modalidades, "animal" se refiere a seres

humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas modalidades, "animal" se refiere a

animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En determinadas modalidades, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, una vaca, un primate y/o un cerdo). En algunas modalidades, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas modalidades, un animal puede ser un animal transgénico, animal manipulado por ingeniería genética y/o un clon.

[0132] Autólogo: Como se usa en la presente descripción, el término “autólogo” se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo en el que va a reintroducirse posteriormente en el individuo.

[0133] Alogénico: Como se usa en la presente descripción, “alogénico” se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se introduce el material. Se considera que dos o más personas son alogénicas entre sí cuando los genes en uno o más locus no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser lo suficientemente distinto genéticamente para interactuar antigénicamente.

[0134] Anticuerpo o agente de unión a antígenos: Como se usa en la presente descripción, el término “anticuerpo” o “agente de unión a antígenos” se refiere a un polipéptido que incluye elementos de secuencia de inmunoglobulina canónica suficientes para conferir unión específica a un antígeno diana particular. Los expertos en la técnica apreciarán que los términos pueden usarse en la presente indistintamente. En algunas modalidades, tal como se usa en la presente descripción, el término “anticuerpo” o “agente de unión al antígeno” también se refiere a un “fragmento de anticuerpo” o “fragmentos de anticuerpo”, que incluye una parte de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región de unión al antígeno o región variable de un anticuerpo. Los ejemplos de “fragmentos de anticuerpos” incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; triacuerpos; tetracuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple; y restos que contienen CDR incluidos en anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los expertos en la técnica apreciarán que el término “fragmento de anticuerpo” no implica y no se restringe a ningún modo particular de generación. Un fragmento de anticuerpo puede producirse mediante el uso de cualquier metodología adecuada, que incluye, pero no se limita a, la escisión de un anticuerpo intacto, síntesis química, producción recombinante, etc. Como se conoce en la técnica, los anticuerpos intactos producidos en la

naturaleza son agentes tetraméricos de aproximadamente 150 kD compuestos por dos polipéptidos de cadena pesada idénticos (de alrededor de 50 kD cada uno) y dos polipéptidos de cadena ligera idénticos (de alrededor de 25 kD cada uno) que se asocian entre sí en lo que se denomina comúnmente una estructura “con forma de Y”. Cada cadena

5 pesada está compuesta por al menos cuatro dominios (en cada caso con alrededor de 110 aminoácidos de longitud): un dominio variable (V_H) de extremo amino (ubicado en las puntas de la estructura Y), seguido por tres dominios constantes: C_H1 , C_H2 y el C_H3 de extremo carboxi (ubicado en la base del tallo de la Y). Una región corta, conocida como el “interruptor”, conecta las regiones variables y constantes de cadena pesada. La “bisagra”

10 conecta los dominios C_H2 y C_H3 con el resto del anticuerpo. Dos enlaces disulfuro en esta región bisagra conectan los dos polipéptidos de cadena pesada entre sí en un anticuerpo intacto. Cada cadena ligera está compuesta por dos dominios: un dominio variable de extremo amino (V_L), seguido por un dominio constante de extremo carboxi (C_L), separados entre sí por otro “interruptor”. Los tetrámeros de anticuerpos intactos están compuestos por

15 dos dímeros de cadena pesada-cadena ligera en los que las cadenas pesada y ligera se enlazan entre sí mediante un solo enlace disulfuro; otros dos enlaces disulfuro conectan las regiones bisagra de cadena pesada entre sí, de forma tal que los dímeros se conectan entre sí y se forma el tetrámero. Los anticuerpos producidos naturalmente también se glicosilan, normalmente en el dominio C_H2 . Cada dominio en un anticuerpo natural tiene una estructura

20 caracterizada por un “pliegue de inmunoglobulina” formado a partir de dos láminas beta (por ejemplo, láminas de 3, 4 o 5 cadenas) envasadas entre sí en un barril beta antiparalelo comprimido. Cada dominio variable contiene tres bucles hipervariables conocidos como “regiones de determinación del complemento” (CDR1, CDR2 y CDR3) y cuatro regiones “marco” con cierta invariabilidad (FR1, FR2, FR3 y FR4). Cuando los anticuerpos naturales

25 se pliegan, las regiones FR forman las láminas beta que proporcionan el marco estructural para los dominios, y las regiones de bucle de CDR tanto de las cadenas pesadas como ligeras se juntan en un espacio tridimensional de forma tal que crean un solo sitio de unión al antígeno hipervariable localizado en la punta de la estructura Y. Las comparaciones de

30 secuencias de aminoácidos entre las cadenas de polipéptidos de anticuerpos han definido dos clases de cadena ligera (κ y λ), varias clases de cadena pesada (por ejemplo, μ , γ , α , ϵ , δ), y determinadas subclases de cadena pesada ($\alpha1$, $\alpha2$, $\gamma1$, $\gamma2$, $\gamma3$ y $\gamma4$). Las clases de anticuerpos (IgA [que incluye la IgA1, IgA2], IgD, IgE, IgG [que incluye la IgG1, IgG2, IgG3

e IgG4], e IgM) se definen en función de la clase de las secuencias de cadena pesada utilizadas.

[0135] A los efectos de la presente invención, en determinadas modalidades, cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que incluye secuencias de dominio de inmunoglobulina suficientes tal como se encuentra en anticuerpos naturales puede denominarse y/o usarse como un “anticuerpo” o “agente de unión a antígeno”, ya sea que ese polipéptido se produzca naturalmente (por ejemplo, generado por un organismo que reaccione a un antígeno), o se produzca mediante ingeniería recombinante, síntesis química u otro sistema o metodología artificial. En algunas modalidades, un anticuerpo es monoclonal; en algunas modalidades, un anticuerpo es policlonal. En algunas modalidades, un anticuerpo tiene secuencias de región constante que son características de anticuerpos de ratón, conejo, primate o ser humano. En algunas modalidades, los elementos de secuencias de anticuerpos son humanizados, primatizados, quiméricos, etc., como se conoce en la técnica. Además, se entenderá que el término “anticuerpo” o “agente de unión a antígenos” como se usa en la presente descripción abarca (a menos que se indique de cualquier otra manera o esté claro a partir del contexto), que puede referirse en modalidades apropiadas a cualquiera de las construcciones o los formatos conocidos o desarrollados en la técnica para capturar características estructurales y funcionales de anticuerpos en una presentación alternativa. Por ejemplo, en algunas modalidades, los términos pueden referirse a anticuerpos bi o multiespecíficos (por ejemplo, zybodies, etc.), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (“SMIPsTM”), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de camélidos y/o fragmentos de anticuerpos. En algunas modalidades, un anticuerpo puede carecer de una modificación covalente (por ejemplo, acoplamiento de un glicano) que tendría si se produjera naturalmente. En algunas modalidades, un anticuerpo puede contener una modificación covalente (por ejemplo, acoplamiento de un glicano, una carga activa [por ejemplo, un resto detectable, un resto terapéutico, un resto catalítico, etc.], u otro grupo colgante [por ejemplo, polietilenglicol, etc.]).

[0136] *Aproximadamente o alrededor de:* Tal como se usa en la presente descripción, el término “aproximadamente” o “alrededor de”, tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En determinadas modalidades, el término “aproximadamente” o “alrededor de” se refiere a un intervalo de valores dentro de 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12

%, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor o menor) del valor de referencia indicado a menos que se indique de cualquier otra manera o sea de cualquier otra manera evidente a partir del contexto (excepto cuando tal número supere el 100 % de un valor posible). Se entiende que cuando se usa el término "aproximadamente" o "aproximadamente" para modificar un valor de referencia establecido, el valor de referencia establecido en sí mismo se cubre junto con los valores que están cerca del valor de referencia establecido a ambos lados del valor de referencia establecido.

[0137] Linfocito T CAR blindado: Como se usa en la presente descripción, el término "células CAR blindadas" o "linfocitos T CAR blindados" se refiere a células manipuladas por ingeniería genética con la capacidad de evadir la inmunosupresión tumoral y la hipofunción T CAR inducida por tumores. En algunas modalidades, un linfocito T CAR blindado comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce un antígeno asociado al cáncer y un modulador de la ruta de señalización del TGF β .

[0138] Región de Determinación de Complementariedad (CDR): Una "CDR" de un dominio variable consiste en residuos de aminoácidos dentro de la región variable que se identifican de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, la acumulación de Kabat y Chothia, AbM, las definiciones de contacto y/o conformación o cualquier método de determinación de CDR muy conocido en la técnica. Las CDR de anticuerpos pueden identificarse como las regiones hipervariables definidas originalmente por Kabat y otros. Ver, por ejemplo, Kabat y otros, 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDR también pueden identificarse como las estructuras de bucles estructurales descritas originalmente por Chothia y otros. Ver, por ejemplo, Chothia y otros, Nature 342: 877-883, 1989. Otros enfoques para la identificación de la CDR incluyen la "definición de AbM", que es un término medio entre Kabat y Chothia y se obtiene mediante el uso del software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys®), o la "definición de contacto" de las CDR en función de los contactos de antígenos observados, establecidos en MacCallum y otros, J. Mol. Biol., 262: 732-745, 1996. En otro enfoque, denominado en la presente descripción como la "definición de conformación" de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los residuos que hacen contribuciones entálpicas a la unión al antígeno. Ver, por ejemplo, Makabe y otros, Journal of Biological Chemistry, 283: 1 156-1166, 2008. Incluso otras definiciones de límites de la CDR pueden no seguir estrictamente

uno de los enfoques anteriores, pero, no obstante, se superpondrán con al menos una parte de las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o prolongarse a la luz de hallazgos predictivos o experimentales de que residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDR enteras no afectan significativamente la unión al antígeno. Como se usa en la presente descripción, una CDR puede referirse a las CDR definidas por cualquier enfoque conocido en la técnica, que incluye las combinaciones de enfoques. Los métodos usados en la presente descripción pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos enfoques. Para cualquier modalidad dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendida, AbM, de contacto y/o conformacional.

[0139] La ***citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos*** o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígenos y, posteriormente, destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos “arman” a las células citotóxicas y son necesarios para destruir la célula diana mediante este mecanismo. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de Fc en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC in vitro, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos núm. 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectoras útiles para esos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes y otros, PNAS USA 95: 652-656 (1998).

[0140] Antígeno: Como se usa en la presente descripción, el término “antígeno” se refiere a un agente que provoca una respuesta inmunitaria; y/o un agente al que se une un receptor de linfocitos T (por ejemplo, cuando es presentado por una molécula MHC) o que se une a un anticuerpo (por ejemplo, producido por un linfocito B) cuando se expone o administra a un organismo. En algunas modalidades, un antígeno provoca una respuesta humoral (por

ejemplo, que incluye la producción de anticuerpos específicos de antígenos) en un organismo; alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, un antígeno provoca una respuesta celular (por ejemplo, que involucra linfocitos T cuyos receptores interactúan específicamente con el antígeno) en un organismo. Los expertos en la técnica comprenderán que un antígeno particular puede provocar una respuesta inmunitaria en uno o varios miembros de un organismo diana (por ejemplo, ratones, conejos, primates, seres humanos), pero no en todos los miembros de la especie de organismo diana. En algunas modalidades, un antígeno provoca una respuesta inmunitaria en al menos alrededor de 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de los miembros de una especie de organismo diana. En algunas modalidades, un antígeno se une a un anticuerpo y/o receptor de linfocitos T, y puede o no inducir una respuesta fisiológica particular en un organismo. En algunas modalidades, por ejemplo, un antígeno puede unirse a un anticuerpo y/o a un receptor de linfocitos T in vitro, ya sea que dicha interacción ocurra o no in vivo. En algunas modalidades, un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, que incluye aquellos inducidos por inmunógenos heterólogos.

[0141] Asociado con: Dos eventos o entidades se “asocian” entre sí, tal como ese término se usa en la presente descripción, si la presencia, el nivel y/o la forma de uno se correlaciona con la del otro. Por ejemplo, una entidad particular (por ejemplo, un polipéptido) se considera asociada a una enfermedad, un trastorno o una afección particular, si su presencia, nivel y/o forma se correlaciona con la incidencia y/o susceptibilidad con respecto a la enfermedad, el trastorno o la afección (por ejemplo, a través de una población de importancia). En algunas modalidades, dos o más entidades están físicamente “asociadas” entre sí si interactúan, directa o indirectamente, de manera que estén y permanezcan en proximidad física entre sí. En algunas modalidades, dos o más entidades que están físicamente asociadas entre sí se unen covalentemente entre sí; en algunas modalidades, dos o más entidades que están físicamente asociadas entre sí no se unen covalentemente entre sí pero están asociadas de forma no covalente, por ejemplo por medio de enlaces de hidrógeno, interacción de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, magnetismo, y sus combinaciones. En algunas modalidades, el término "asociado con", en referencia a un "antígeno asociado con una célula cancerígena" se refiere a la presencia de un antígeno particular en la superficie de una célula cancerígena.

[0142] Unión: Se entenderá que el término “unión”, como se usa en la presente descripción, normalmente se refiere a una asociación no covalente entre dos o más entidades. La unión “directa” implica el contacto físico entre entidades o restos; la unión indirecta implica la interacción física por medio del contacto físico con una o más entidades intermedias. La unión entre dos o más entidades puede evaluarse en cualquiera de una variedad de contextos, que incluye el estudio de las entidades o los restos en interacción aislados o en el contexto de sistemas más complejos (por ejemplo, mientras se asocian covalentemente o de cualquier otra manera con una entidad portadora y/o en un sistema biológico o una célula). Tal como se usa en la presente descripción, “ K_a ” se refiere a una tasa de asociación de un resto de unión particular y una diana para formar un complejo de resto de unión/diana. Tal como se usa en la presente descripción, “ K_d ” se refiere a una tasa de disociación de un complejo de resto de unión/diana particular. Como se usa en la presente descripción, “ K_D ” se refiere a una constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de K_d con respecto a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D pueden determinarse mediante el uso de métodos bien establecidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de resonancia de plasmones superficiales, o mediante el uso de un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

[0143] Portador: Como se usa en la presente descripción, el término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra una composición. En algunos ejemplos de modalidades, los portadores pueden incluir líquidos estériles, tales como, por ejemplo, agua y aceites, que incluyen aceites de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. En algunas modalidades, los portadores son o incluyen uno o más componentes sólidos.

[0144] Parte característica: Tal como se usa en la presente descripción, la expresión “parte característica” se usa, en el sentido más amplio, para referirse a una parte de una sustancia cuya presencia (o ausencia) se correlaciona con la presencia (o ausencia) de una característica, un atributo o una actividad particular de la sustancia. En algunas modalidades, una parte característica de una sustancia es una parte que se encuentra en la sustancia y en sustancias relacionadas que comparten la característica, el atributo o la actividad particular, pero no en aquellas que no comparten la característica, el atributo o la actividad particular.

[0145] Receptor de antígeno quimérico: El término "receptor de antígeno quimérico" o

"CAR" como se usa en la presente descripción se refiere a un receptor diseñado que consta de uno o más de un dominio de unión a la diana extracelular (por ejemplo, derivado de un anticuerpo), una región transmembrana y uno o más dominios efectores intracelulares. Los

5 CAR generalmente se introducen en las células inmunitarias, como los linfocitos T, para redirigir la especificidad de un antígeno de superficie celular deseado o un complejo MHC-péptido. Estos receptores sintéticos normalmente contienen un dominio de unión a la diana que está asociado con uno o más dominios de señalización a través de un conector flexible

en una sola molécula de fusión. El dominio de unión al objetivo se usa para dirigir la célula

10 inmunitaria (por ejemplo, un linfocito T) a dianas específicas en la superficie de las células patológicas (por ejemplo, una célula cancerígena) y los dominios de señalización contienen maquinaria molecular para la activación y proliferación de la célula inmunitaria (por ejemplo,

un linfocito T). El enlazador flexible que normalmente pasa a través de la membrana de la célula inmunitaria (por ejemplo, linfocito T) (es decir, al formar un dominio transmembrana)

15 permite la visualización en la membrana celular del dominio de unión diana del CAR. Los

CAR han permitido con éxito que las células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos T) se redirijan contra los antígenos expresados en la superficie de las células tumorales de

diversas neoplasias malignas, que incluye linfomas y tumores sólidos (Gross y otros, (1989) Transplant Proc., 21(1 Parte 1): 127-30; Jena y otros, (2010) Blood, 116(7): 1035-44). El

20 dominio de unión extracelular de un CAR puede estar compuesto por un fragmento variable de cadena única (scFv) derivado de la fusión de las regiones pesadas y ligeras variables de un anticuerpo monoclonal murino o humanizado. En algunas modalidades, el dominio de

unión extracelular comprende un anticuerpo de dominio único. Alternativamente, pueden usarse scFv que se derivan de Fab (en lugar de un anticuerpo, por ejemplo, obtenido de

25 bibliotecas de Fab). En diversas modalidades, este scFv se fusiona con un dominio transmembrana y luego con un dominio de señalización intracelular.

[0146] Se han desarrollado al menos tres generaciones de CAR. Los CAR de primera generación comprendían dominios de unión a diana unidos a un dominio de señalización

derivado de la región citoplásmica de las cadenas gamma del receptor CD3zeta o Fc. Se

30 demostró que los CAR de primera generación redirigen con éxito los linfocitos T a la diana seleccionada, pero no lograron proporcionar una expansión prolongada y actividad antitumoral *in vivo*. Los CAR de segunda y tercera generación se han centrado en mejorar

la supervivencia de los linfocitos T modificados y aumentar la proliferación al incluir moléculas coestimuladoras, tal como CD28, OX-40 (CD134) y 4-1BB (CD137). Las modalidades descritas en la presente descripción se centran, en parte, en mejorar aún más las inmunoterapias que contienen T CAR, por ejemplo, al proteger un T CAR con un modulator de la ruta de señalización del TGF β , lo que hace que las inmunoterapias sean más eficaces cuando se tratan cánceres, especialmente cánceres de tumores sólidos. Los CAR blindados proporcionados en la presente descripción mejoran o mejoran la función T CAR y la supervivencia frente a un microambiente tumoral hostil en relación con un linfocito T CAR no blindado.

[0147] Optimización de codones: Como se usa en la presente descripción, una secuencia de ácido nucleico “con optimización de codones” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se ha alterado de manera que la traducción de la secuencia de ácido nucleico y la expresión de la proteína resultante se mejore y optimice para un sistema de expresión particular. Una secuencia de ácido nucleico “con optimización de codones” codifica la misma proteína que una secuencia original no optimizada en la que se basa la secuencia de ácido nucleico “con optimización de codones”. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico puede someterse a una “optimización de codones” para la expresión en células de mamíferos (por ejemplo, células CHO, células humanas, células de ratón, etc.), células bacterianas (por ejemplo, E. coli), células de insectos, células de levadura o células vegetales.

[0148] Comparable: El término “comparable”, como se usa en la presente descripción, se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc. que pueden no ser idénticos entre sí, pero que son lo suficientemente similares para permitir la comparación entre ellos, de manera tal que pueden sacarse conclusiones razonables en función de las diferencias o similitudes observadas. Los expertos en la técnica comprenderán, en contexto, qué grado de identidad se requiere en cualquier circunstancia determinada para que dos o más de dichos agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc. se consideren comparables.

[0149] Correspondiente a: Como se usa en la presente descripción, el término “correspondiente a” a menudo se usa para designar la posición/identidad de un residuo de aminoácido en un polipéptido de interés. Los expertos se darán cuenta que, con fines de simplicidad, los residuos en un polipéptido a menudo se designan mediante el uso de un

sistema de numeración canónico basado en un polipéptido relacionado de referencia, de forma tal que un aminoácido “correspondiente a” un residuo en la posición 190, por ejemplo, no necesita ser realmente el aminoácido 190 en una cadena de aminoácidos particular, sino que se corresponde con el residuo encontrado en 190 en el polipéptido de referencia; los expertos en la técnica aprecian fácilmente cómo identificar aminoácidos “correspondientes”.

[0150] Derivado/a de: Como se usa en la presente descripción, una secuencia “derivada de” o “específica para una secuencia designada” se refiere a una secuencia que comprende una secuencia contigua de alrededor de al menos 6 nucleótidos o al menos 2 aminoácidos, al menos alrededor de 9 nucleótidos o al menos 3 aminoácidos, al menos alrededor de 10-12 nucleótidos o 4 aminoácidos, o al menos alrededor de 15-21 nucleótidos o 5-7 aminoácidos correspondientes, es decir, idénticos o complementarios con respecto a, por ejemplo, una región contigua de la secuencia designada. En determinadas modalidades, la secuencia comprende la totalidad de una secuencia de nucleótidos o aminoácidos designada. La secuencia puede ser complementaria (en el caso de una secuencia de polinucleótidos) o idéntica a una región de secuencia que es única para una secuencia particular según lo determinado mediante técnicas conocidas en la técnica. Las regiones de las que pueden derivar secuencias, incluyen pero no se limitan a, regiones que codifican epítomos específicos, regiones que codifican CDR, regiones que codifican secuencias marco, regiones que codifican regiones de dominio constante, regiones que codifican regiones de dominio variable, así como también regiones no traducidas y/o no transcritas. La secuencia derivada no necesariamente derivará físicamente de la secuencia de interés en estudio, sino que puede generarse de cualquier manera, lo cual incluye, pero no se limita a, síntesis química, replicación, transcripción inversa o transcripción, que se basa en la información proporcionada por la secuencia de bases en la o las regiones de las que deriva el polinucleótido. De esa manera, puede representar una orientación sentido o antisentido del polinucleótido original. Además, las combinaciones de regiones correspondientes a la de la secuencia designada pueden modificarse o combinarse de maneras conocidas en la técnica para que coincidan con el uso previsto. Por ejemplo, una secuencia puede comprender dos o más secuencias contiguas que comprendan cada una parte de una secuencia designada, y se interrumpen con una región que no es idéntica a la secuencia designada, pero que pretende representar una secuencia derivada de la secuencia designada. Con respecto a las moléculas de anticuerpos, “derivado de este” incluye una

molécula de anticuerpo que está funcional o estructuralmente relacionada con un anticuerpo de comparación, por ejemplo, “derivado de este” incluye una molécula de anticuerpo que tiene una secuencia o estructura similar o sustancialmente igual, por ejemplo, que tiene CDR, regiones marco o regiones variables iguales o similares. “Derivado de este” para un anticuerpo también incluye residuos, por ejemplo, uno o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más residuos, que pueden o no ser contiguos, pero se definen o identifican de acuerdo con un esquema de numeración u homología con respecto a la estructura general del anticuerpo o proximidad tridimensional, es decir, dentro de una CDR o una región marco, de una secuencia de comparación. La expresión “derivado de este” no se limita a la derivación física, sino que también incluye la generación de cualquier manera, por ejemplo, mediante el uso de información de secuencia a partir de un anticuerpo de comparación para diseñar otro anticuerpo.

[0151] Determinar: Muchas metodologías descritas en la presente descripción incluyen una etapa de “determinación”. Los expertos en la técnica, que lean la presente memoria descriptiva, comprenderán que esa “determinación” puede utilizar cualquiera de una variedad de técnicas disponibles para los expertos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, técnicas específicas a las que se hace referencia explícitamente en la presente descripción. En algunas modalidades, una determinación implica la manipulación de una muestra física. En algunas modalidades, una determinación implica la consideración y/o manipulación de datos o información, por ejemplo, mediante el uso de una computadora u otra unidad de procesamiento adaptada para realizar un análisis pertinente. En algunas modalidades, una determinación implica recibir información y/o materiales relevantes de una fuente. En algunas modalidades, determinar implica comparar una o más características de una muestra o entidad con una referencia comparable.

[0152] Manipulado por ingeniería genética: El término “manipulado por ingeniería genética”, como se usa en la presente descripción, describe un polinucleótido, un polipéptido o una célula que se ha diseñado o modificado artificialmente y/o cuya existencia y producción requieren intervención y/o actividad humana. Por ejemplo, una célula manipulada por ingeniería genética que está diseñada intencionalmente para provocar un efecto particular y que difiere del efecto de las células que se producen naturalmente del mismo tipo. En algunas modalidades, una célula manipulada por ingeniería genética expresa un receptor quimérico para el antígeno descrito en la presente.

[0153] Funciones efectoras: Como se usa en la presente descripción, la expresión “funciones efectoras” se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a un agente de unión al antígeno descrito en la presente descripción. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptores de linfocitos B; y activación de linfocitos B. Función efectora del anticuerpo “reducida o minimizada” significa que se reduce en al menos 50 % (alternativamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) con respecto al anticuerpo natural o no modificado. La determinación de la función efectora del anticuerpo es fácilmente determinable y medible por un experto en la técnica. En algunas modalidades, las funciones efectoras de anticuerpos de unión al complemento, citotoxicidad dependiente del complemento y citotoxicidad dependiente del anticuerpo se ven afectadas. En algunas modalidades, la función efectora se elimina a través de una mutación en la región constante que eliminó la glucosilación, por ejemplo, “mutación sin efector”. En un aspecto, la mutación sin efector es una mutación N297A o DANA (D265A+N297A) en la región CH2. Shields y otros, J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604 (2001). Alternativamente, las mutaciones adicionales que resultan en una reducción o eliminación de la función efectora incluyen: K322A y L234A/L235A (LALA). Alternativamente, la función efectora puede reducirse o eliminarse a través de técnicas de producción, tales como la expresión en células hospederas que no se glicosilan (por ejemplo, E. coli) o en las que resultan en un patrón de glicosilación alterado que es inefectiva o menos efectiva a la hora de promover la función efectora (por ejemplo, Shinkawa y otros, J. Biol. Chem. 278(5): 3466-3473 (2003).

[0154] Epítipo: Como se usa en la presente descripción, el término “epítipo” incluye cualquier resto que es reconocido específicamente por un componente de unión a inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpo o receptor) en su totalidad o en parte. En algunas modalidades, un epítipo comprende múltiples aminoácidos en un antígeno. En algunas modalidades, esos residuos de aminoácidos se exponen en la superficie cuando el antígeno adopta una conformación tridimensional pertinente. En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos están físicamente cerca o se contornean entre sí en el espacio cuando el antígeno adopta esa conformación. En algunas modalidades, al menos algunos de los

aminoácidos se separan físicamente entre sí cuando el antígeno adopta una conformación alternativa (por ejemplo, se linealiza; por ejemplo, un epítipo no lineal).

[0155] Excipiente: Como se usa en la presente descripción, el término “excipiente” se refiere a un agente no terapéutico que puede incluirse en una composición farmacéutica, por ejemplo, para proporcionar o contribuir con una consistencia o un efecto estabilizador deseado. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares.

[0156] Expresión: El término “expresión” o “expresado”, cuando se usa en referencia a un ácido nucleico en la presente descripción, se refiere a uno o más de los siguientes eventos: (1) producción de una transcripción de ARN de una plantilla de ADN (por ejemplo, mediante transcripción); (2) procesamiento de una transcripción de ARN (por ejemplo, mediante corte y empalme, edición, formación de casquete 5' y/o formación de extremo 3'); (3) traducción de un ARN en un polipéptido; y/o (4) modificación posterior a la traducción de un polipéptido.

[0157] Ex vivo: Como se usa en la presente descripción, el término “ex vivo” significa un proceso en el que se extraen células de un organismo vivo y se propagan fuera del organismo (por ejemplo, en un tubo de ensayo, en una bolsa de cultivo, en un biorreactor).

[0158] Proteína de fusión: Como se usa en la presente descripción, la expresión “proteína de fusión” se refiere a una proteína codificada por una secuencia de ácido nucleico modificada a partir de secuencias de ácido nucleico que codifican al menos una parte de dos proteínas diferentes (por ejemplo, heterólogas). Como los expertos en la técnica saben sin duda, para crear una proteína de fusión, las secuencias de ácido nucleico se unen de forma tal que el marco de lectura resultante no contenga un codón de terminación interno.

[0159] Hospedero: El término “hospedero” se usa aquí para referirse a humanos o cualquier animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, vaca, cerdo, oveja, caballo, primate no humano) o un sistema (por ejemplo, una célula o línea celular). En algunas modalidades, un hospedero es un organismo al que se le administra una célula o población de células que expresan un modulador de CAR y/o TGFβ descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la administración de la población de células da como resultado una respuesta inmunitaria mejorada en el hospedero.

[0160] Célula hospedera: Como se usa en la presente descripción, la expresión “célula

hospedera” se refiere a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno (recombinante o de otro tipo). Por ejemplo, las células hospederas pueden usarse para producir la molécula de CAR modificada como se describe en la presente mediante técnicas recombinantes estándares. Los expertos al leer la presente descripción comprenderán que esos términos se refieren no solo a la célula particular, sino también a la progenie de esa célula. Debido a que determinadas modificaciones pueden ocurrir en generaciones posteriores debido a una mutación o influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula original, pero aun así incluirse dentro del alcance de la expresión “*célula hospedera*” como se usa en la presente descripción.

- 10 **[0161]** En algunas modalidades, las células hospederas se refieren a células humanas. En algunas modalidades, las células hospederas incluyen cualquier célula procariota y eucariota adecuada para expresar un ADN exógeno (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico recombinante). Los ejemplos de células incluyen aquellas de procariotas y eucariotas (una sola célula o múltiples células), células bacterianas (por ejemplo, cepas de
- 15 E. coli, Bacillus spp., Streptomyces spp., etc.), células micobacterianas, células fúngicas, células de levadura (por ejemplo, S. cerevisiae, S. pombe, P. pastoris, P. methanolica, etc.), células de plantas, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos derivadas de baculovirus, Trichoplusia ni, etc.), células de animales no humanos, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas
- 20 modalidades, la célula es una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En algunas modalidades, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), células retinianas, Vero, CV1, renales (por ejemplo, HEK293, HEK293T, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por
- 25 ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (de epidermis), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas modalidades, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6™).
- 30 **[0162] Respuesta inmunitaria:** Como se usa en la presente descripción, la expresión “respuesta inmunitaria” se refiere a una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como un linfocito B, linfocito T, célula dendrítica, macrófago o polimorfonucleocito, a un

estímulo tal como un antígeno o una vacuna. Una respuesta inmunitaria puede incluir cualquier célula del cuerpo involucrada en una respuesta de defensa del hospedero, lo cual incluye, por ejemplo, una célula epitelial que secreta un interferón o una citocina. Una respuesta inmunitaria incluye, pero no se limita a, una respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa. Los métodos para medir las respuestas inmunitarias se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, medir la proliferación y/o actividad de linfocitos (tales como linfocitos B o T), secreción de citocinas o quimiocinas, inflamación, producción de anticuerpos y similares. En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria se refiere a la respuesta inmunitaria observada después de la administración de linfocitos T CAR blindados o no blindados descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, una respuesta inmunitaria tras la administración de linfocitos T CAR blindados descritos en la presente descripción se mide mediante uno o más de aumento de la proliferación de las células que expresan CAR, aumento de la producción de IFN γ por parte de las células que expresan CAR, aumento de la producción de IL-2 de las células que expresan CAR, aumentar la proliferación de las células inmunitarias del hospedero, aumentar la producción de IFN γ por parte de las células inmunitarias del hospedero, aumentar la producción de IL-2 de las células inmunitarias del hospedero, aumentar la presentación de antígenos por parte de las células presentadoras de antígenos del hospedero, aumentar la coestimulación por las células presentadoras de antígenos del hospedero, aumentar la activación del endotelio o aumentar la localización tumoral de las células inmunitarias (por ejemplo, células NK, linfocitos T, macrófagos) .

[0163] *In vitro*: Como se usa en la presente descripción, la expresión “*in vitro*” se refiere a instancias que ocurren en un ambiente artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc. en lugar de dentro de un organismo multicelular.

[0164] *In vivo*: Tal como se usa en la presente descripción, el término “*in vivo*” se refiere a eventos que ocurren dentro de un organismo multicelular, tal como un ser humano y un animal no humano. En el contexto de los sistemas basados en células, el término puede usarse para referirse a eventos que ocurren dentro de una célula viva (en lugar de, por ejemplo, sistemas *in vitro*).

[0165] *Aislada*: Como se usa en la presente descripción, el término “aislada” se refiere a una sustancia y/o entidad que ha sido (1) separada de al menos algunos de los

componentes con los que se ha asociado cuando se produjo al inicio (ya sea en un estado natural y/o en un contexto experimental), y/o (2) diseñada, producida, preparada y/o fabricada con intervención humana. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden estar separadas de alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 91 %, alrededor de 92 %, alrededor de 93 %, alrededor de 94 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 %, o más que alrededor de 99 % de los otros componentes con los cuales se habían asociado al inicio. En algunas modalidades, agentes aislados son alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 91 %, alrededor de 92 %, alrededor de 93 %, alrededor de 94 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más que alrededor de 99 % puros. Tal como se usa en la presente descripción, una sustancia es “pura” si está sustancialmente libre de otros componentes. En algunas modalidades, como comprenderán los expertos en la técnica, una sustancia puede seguirse considerando “aislada” o incluso “pura”, después de haber sido combinada con determinados otros componentes tales como, por ejemplo, uno o más portadores o excipientes (por ejemplo, tampón, solvente, agua, etc.); en esas modalidades, el porcentaje de aislamiento o pureza de la sustancia se calcula sin que se incluyan esos portadores o excipientes. Para proporcionar un simple ejemplo, en algunas modalidades, un polímero biológico tal como un polipéptido o polinucleótido que se produce en la naturaleza se considera “aislado” cuando, a) en virtud de su origen o fuente de derivación no se asocia con algunos o todos los componentes que lo acompañan en su estado natural por naturaleza; b) está sustancialmente libre de otros polipéptidos o ácidos nucleicos de la misma especie con respecto a la especie que lo produce de manera natural; c) es expresado por o se asocia de otro modo con componentes de una célula u otro sistema de expresión que no es de la especie que lo produce en naturaleza. Por lo tanto, por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente del que lo produce en la naturaleza se considera un polipéptido “aislado”. En algunas modalidades, una célula puede ser una “célula aislada” que se separa de los componentes moleculares y/o celulares que acompañan naturalmente a la célula. Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, una célula que se ha sometido a una o más técnicas de purificación puede considerarse una célula “aislada” en la medida en que

se ha separado de otros componentes a) con los que se asocia por naturaleza; y/o b) con los que se asoció cuando se produjo inicialmente.

[0166] Enlazador: Como se usa en la presente descripción, el término "enlazador" se refiere a un grupo funcional (por ejemplo, químico o polipéptido) que une covalentemente dos o más polipéptidos o ácidos nucleicos para que estén conectados entre sí. Como se usa en la presente descripción, un "enlazador peptídico" se refiere a uno o más aminoácidos usados para acoplar dos proteínas entre sí (por ejemplo, para acoplar los dominios VH y VL).

[0167] Modular o Modulador: Como se usa en la presente descripción, el término "modular" o "modulador" se refiere a la capacidad de un componente para alterar positiva o negativamente una función asociada. Los ejemplos de modulaciones incluyen un cambio de aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 75 % o aproximadamente 100 %. Por ejemplo, en la presente descripción se proporcionan moduladores de señalización del TGFB capaces de alterar o prevenir la señalización del receptor TGF β . Un experto en la técnica entendería que esto puede lograrse mediante la unión a la citocina (es decir, TGF β) que activa la señalización del TGF β R, o el propio receptor (por ejemplo, un anticuerpo TGF β o fragmento del mismo, un anticuerpo TGFBR o fragmento de este). Por lo tanto, este término abarca tanto moléculas que se unen al TGF β como moléculas que se unen al TGF β R. En una modalidad, el modulador de la divulgación puede neutralizar la señalización del TGF β a través del TGF β RII. Por "neutralizar", se entiende que el efecto de señalización normal del TGF β se bloquea de manera que la presencia del TGF β tiene un efecto neutral sobre la señalización del TGF β RII. En algunas modalidades, los moduladores del TGF β mejoran la respuesta inmunitaria en un hospedero.

[0168] Ácido nucleico: Como se usa en la presente descripción, la expresión "ácido nucleico", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que es o puede incorporarse en una cadena de oligonucleótidos. En algunas modalidades, un ácido nucleico es un compuesto y/o una sustancia que es o puede incorporarse en una cadena de oligonucleótidos a través de un enlace fosfodiéster. Como será claro a partir del contexto, en algunas modalidades, "ácido nucleico" se refiere a residuos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); en algunas modalidades, "ácido nucleico" se refiere a una cadena de oligonucleótidos que comprende residuos de ácido

nucleico individuales. En algunas modalidades, un “ácido nucleico” es o comprende ARN; en algunas modalidades, un “ácido nucleico” es o comprende ADN. En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más residuos de ácido nucleico naturales. En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más análogos de ácidos nucleicos. En algunas modalidades, un análogo de ácido nucleico difiere de un ácido nucleico en que no utiliza una estructura principal de fosfodiéster. Por ejemplo, en algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más “ácidos nucleicos peptídicos”, que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la estructura principal, se consideran dentro del alcance de la presente invención. Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, un ácido nucleico tiene uno o más enlaces de fosforotioato y/o 5'-N-fosforamidita en lugar de enlaces fosfodiéster. En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina). En algunas modalidades, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C-5 propil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas y sus combinaciones). En algunas modalidades, un ácido nucleico comprende uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororibosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa, y hexosa) en comparación con aquellos en ácidos nucleicos naturales. En algunas modalidades, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico funcional tal como un ARN o una proteína. En algunas modalidades, un ácido nucleico incluye uno o más intrones. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos se preparan mediante uno o más de aislamiento de una fuente natural, síntesis enzimática mediante polimerización basada en una plantilla complementaria (*in vivo* o *in vitro*), reproducción en una célula o sistema recombinante, y síntesis química. En algunas modalidades, un ácido nucleico tiene al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800,

900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más residuos de longitud. En algunas modalidades, un ácido nucleico es monocatenario; en algunas modalidades, un ácido nucleico es bicatenario. En algunas modalidades, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica, o es el complemento de una secuencia que codifica, un polipéptido. En algunas modalidades, un ácido nucleico tiene actividad enzimática.

[0169] Vehículos farmacéuticamente aceptables: Los portadores farmacéuticamente aceptables (vehículos) útiles en la presente son convencionales. En Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975), se describen composiciones y formulaciones adecuadas para el suministro farmacéutico de una o más composiciones terapéuticas. En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como un vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que se administrarán pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes amortiguadores de pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

[0170] Polipéptido: Un "polipéptido", en términos generales, es una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. En algunas modalidades, un polipéptido puede incluir al menos 3-5 aminoácidos, cada uno de los cuales se une a los otros por medio de al menos un enlace peptídico. Los expertos en la técnica comprenderán que los polipéptidos a veces incluyen aminoácidos "no naturales" u otras entidades que, no obstante, son capaces de integrarse en una cadena de polipéptidos, opcionalmente. En algunas modalidades, el término "polipéptido" se usa para referirse a clases funcionales específicas de polipéptidos, tales como un anticuerpo, receptor quimérico para el antígeno, o polipéptidos de dominio coestimulador, etc. Para cada clase, la presente memoria descriptiva proporciona y/o la técnica es consciente de varios ejemplos de secuencias de

aminoácidos de polipéptidos ilustrativos conocidos dentro de la clase; en algunas modalidades, uno o más de esos polipéptidos conocidos es/son polipéptidos de referencia para la clase. En esas modalidades, el término “polipéptido” se refiere a cualquier miembro de la clase que muestra una homología o identidad de secuencia suficiente con un polipéptido de referencia pertinente que el experto en la técnica apreciaría que debería incluirse en la clase. En muchas modalidades, un miembro de la clase representativa también comparte actividad significativa con el polipéptido de referencia. Por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido miembro muestra un grado general de homología o identidad de secuencia con un polipéptido de referencia que es al menos alrededor de 30-40 %, y a menudo es mayor que alrededor de 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más y/o incluye al menos una región (es decir, una región conservada, que a menudo incluye un elemento de secuencia característico) que muestra una identidad de secuencia muy alta, a menudo mayor que 90 % o incluso 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Dicha región conservada habitualmente abarca al menos 3-4 y a menudo hasta 20 o más aminoácidos; en algunas modalidades, una región conservada abarca al menos una extensión de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos contiguos.

[0171] Se entiende que los anticuerpos y agentes de unión a antígenos de la invención pueden tener sustituciones de aminoácidos conservadoras o no esenciales adicionales, que no tengan un efecto sustancial en las funciones de polipéptidos. Si el hecho de que se tolere o no una sustitución particular, es decir, si esta no afectará negativamente las propiedades biológicas deseadas, tales como la actividad de unión, puede determinarse como se describe en Bowie, J. U. y otros. Science 247: 1306-1310 (1990) o Padlan y otros. FASEB J. 9: 133-139 (1995). Una “sustitución de aminoácidos conservadora” es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y

cadena laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

[0172] Prevención: El término “prevención”, como se usa en la presente descripción, se refiere a la profilaxis, la evasión de la manifestación de la enfermedad, un retraso de la aparición y/o una reducción de la frecuencia y/o gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad, un trastorno o una afección particular (por ejemplo, cáncer). En algunas modalidades, la prevención se evalúa sobre una base poblacional de forma tal que se considera que un agente “previene” una enfermedad, un trastorno o una afección particular si se observa una disminución estadísticamente significativa en el desarrollo, la frecuencia y/o la intensidad de uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno o la afección en una población susceptible a la enfermedad, el trastorno o la afección.

[0173] Pura: Tal como se utiliza en la presente descripción, un agente o entidad es “pura” si está sustancialmente libre de otros componentes. Por ejemplo, una preparación que contiene más de alrededor de 90 % de un agente o una entidad particular se considera normalmente una preparación pura. En algunas modalidades, un agente o una entidad es al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % pura.

[0174] Recombinante: Como se usa en la presente descripción, se pretende que el término “recombinante” se refiera a polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos como se describe en la presente) diseñados, modificados, preparados, expresados, creados o aislados a través de medios recombinantes, tales como polipéptidos expresados mediante el uso de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedera, polipéptidos aislados de un banco de polipéptidos de carácter combinatorio y recombinante o polipéptidos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique cortar y empalmar elementos de secuencias seleccionados entre sí. En algunas modalidades, uno o más de esos elementos de secuencias seleccionados se encuentra en la naturaleza. En algunas modalidades, uno o más de esos elementos de secuencias seleccionados y/o sus combinaciones se diseñan *in silico*. En algunas modalidades, uno o más de esos elementos de secuencias seleccionados son el resultado de la combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) elementos de secuencias conocidos que no están presentes naturalmente en el mismo polipéptido.

[0175] Referencia: El término “referencia” a menudo se usa en la presente para describir un agente, un individuo, una población, una muestra, una secuencia o un valor convencional

o de control con el que se compara un agente, un individuo, una población, una muestra, una secuencia o un valor de interés. En algunas modalidades, un agente, un individuo, una población, una muestra, una secuencia o un valor de referencia se evalúa y/o se determina de manera sustancialmente simultánea con la evaluación o determinación del agente, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. En algunas modalidades, un agente, un individuo, una población, una muestra, una secuencia o un valor de referencia es una referencia histórica, opcionalmente incorporada en un medio tangible. Típicamente, como los expertos en la técnica comprenderían, un agente de referencia, individuo, población, muestra, secuencia o valor se determina o se caracteriza en condiciones comparables a las utilizadas para determinar o caracterizar el agente, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés.

[0176] Anticuerpo de dominio único: como se usa en la presente descripción, los términos “anticuerpo de dominio único (sdAb)”, “dominio único variable” o “dominio variable único de inmunoglobulina (ISV)” “anticuerpo de dominio variable de cadena pesada (VH) único” se refieren al fragmento variable único de un anticuerpo que se une a un antígeno diana. Estos términos se usan indistintamente en la presente descripción. Un sdAb es un solo polipéptido de unión a antígeno que tiene tres regiones de determinación complementarias (CDR). El sdAb solo es capaz de unirse al antígeno sin emparejarse con un polipéptido que contiene la CDR correspondiente. En algunos casos, los anticuerpos de un solo dominio se modifican genéticamente a partir de los HCAb de camélido, y sus dominios variables de cadena pesada se denominan “VHH”. Algunos VHH también se conocen como nanocuerpos. El sdAb de camélido es uno de los fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno más pequeños conocidos (ver, por ejemplo, Hamers-Casterman y otros, Nature 363: 446-8 (1993); Greenberg y otros, Nature 374: 168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh y otros, Nanomedicine (Lond), 8: 1013-26 (2013)). Un VHH básico tiene la siguiente estructura desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, en donde FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en donde CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3. Los dominios VHH de camélidos pueden humanizarse de acuerdo con las técnicas estándar disponibles en la técnica, y dichos dominios se consideran “anticuerpos de dominio”. Como se usa en la presente descripción, VH incluye dominios VHH de camélidos y el término VHH puede usarse para referirse a anticuerpos de dominio de origen humano

o de camélido que comprenden solo una cadena pesada. Como se explica más abajo, algunas modalidades de los diversos aspectos de la invención se refieren a un agente de unión que comprende un único dominio variable de cadena pesada de anticuerpos/dominio variable único de cadena pesada de inmunoglobulina que se une a un antígeno del TGFB en ausencia de cadena ligera.

[0177] Sujeto: Como se usa en la presente descripción, el término “sujeto” significa cualquier mamífero, lo cual incluye seres humanos. En determinadas modalidades de la presente invención, el sujeto es un adulto, un adolescente o un niño. En algunas modalidades, se usan los términos “individual” o “paciente” y se pretende que sean intercambiables con “sujeto”. La presente invención también contempla la administración de las composiciones farmacéuticas y/o la realización de los métodos de tratamiento in utero. Por ejemplo, un sujeto puede ser un paciente (por ejemplo, un paciente humano o un paciente veterinario) con un cáncer (por ejemplo, de origen gastrointestinal), un síntoma de un cáncer, en el que al menos algunas de las células expresen el TGF β , o una predisposición a un cáncer, en el que al menos algunas de las células expresen GCC. El término “animales no humanos” de la invención incluye a todos los vertebrados no humanos, por ejemplo, mamíferos no humanos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc., a menos que se indique de cualquier otra manera.

[0178] Sustancialmente: Como se usa en la presente descripción, el término “sustancialmente” se refiere a la condición cualitativa de presentar un grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en la técnica biológica comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, si es que alguna vez, llegan a completarse y/o prosiguen hasta completarse o logran o evitan un resultado absoluto. El término “sustancialmente” se usa por lo tanto en la presente para capturar la posible falta de integridad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

[0179] Agente terapéutico: Como se usa en la presente descripción, la expresión “agente terapéutico” se refiere a un agente (por ejemplo, un agente de unión a antígenos) que tiene actividad biológica. El término se usa en la presente descripción para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto conformado por materiales biológicos. En algunas modalidades, el agente terapéutico puede ser un agente contra el cáncer o un agente quimioterápico. Como se usan en la

presente descripción, las expresiones “agente antineoplásico” o “agente quimioterapéutico” se refieren a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir el desarrollo o la progresión de una neoplasia en un ser humano, particularmente una lesión maligna (cancerígena), tal como carcinoma, sarcoma, linfoma o leucemia. La inhibición de la metástasis o la angiogénesis con frecuencia es una propiedad de los agentes antineoplásicos o quimioterápicos. Un agente quimioterápico puede ser un agente citotóxico o citostático. La expresión “agente citostático” se refiere a un agente que inhibe o suprime el crecimiento celular y/o la multiplicación de células.

[0180] Transformación: Como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier proceso mediante el cual se introduce ADN exógeno en una célula hospedera. La transformación puede producirse en condiciones naturales o artificiales mediante el uso de varios métodos conocidos en la técnica. La transformación puede depender de cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extrañas en una célula hospedera procariota o eucariota. En algunas modalidades, una metodología de transformación particular se selecciona en base a la célula hospedera que se transforma y puede incluir, pero no se limita a, infección viral, electroporación, emparejamiento, lipofección. En algunas modalidades, una célula "*transformada*" se transforma de manera estable en cuanto a que el ADN insertado es capaz de replicarse ya sea como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma hospedador. En algunas modalidades, una célula transformada expresa transitoriamente el ácido nucleico introducido durante períodos limitados de tiempo.

[0181] Factor de Crecimiento Transformador- β (TGF β): Como se usa en la presente descripción, los términos "TGF-beta", "TGFb", "TGF β " y "factor de crecimiento transformador-beta" se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a la familia de moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa de cualquiera de los TGF-beta de humanos, que incluye las formas latentes y el complejo asociado o no asociado del TGF-beta precursor y maduro ("TGF-beta latente"). La referencia a dicho TGF-beta en la presente descripción se entenderá como una referencia a cualquiera de las formas actualmente identificadas, que incluye TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4 y TGF-beta5 y versiones latentes de los mismos, así como también a las especies del TGF-beta humano identificadas en el futuro, que incluye polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier TGF-beta conocido y siendo al menos aproximadamente el 75

%, preferentemente al menos aproximadamente 80 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 85 %, aún más preferente al menos aproximadamente 90 %, y aún más preferente al menos alrededor del 95 % de homólogos con la secuencia. Los términos específicos "TGF-beta1", "TGF-beta2" y "TGF-beta3", así como también "TGF-beta4" y "TGF-beta5", se refieren a los TGF-betas definidos en la literatura, por ejemplo, Derynck y otros, Nature, supra, Seyedin y otros, J. Biol. Chem., 262, supra, y deMartin y otros, supra. El término "TGF-beta" se refiere al gen que codifica el TGF-beta humano. El TGF-beta preferente es el TGF-beta humano de secuencia nativa.

[0182] Los miembros de la familia TGF-beta se definen como aquellos que tienen nueve residuos de cisteína en la porción madura de la molécula, comparten al menos un 65 % de homología con otras secuencias conocidas del TGF-beta en la región madura y pueden competir por el mismo receptor. Además, todos parecen estar codificados como un precursor más grande que comparte una región de alta homología cerca del extremo N y muestra la conservación de tres residuos de cisteína en la porción del precursor que luego se eliminará mediante el procesamiento. Además, los TGF-betas parecen tener un sitio de procesamiento con cuatro o cinco aminoácidos.

[0183] Receptor del Factor de Crecimiento Transformador- β (TGF β R): Como se usa en la presente descripción, el término "TGF-bR" o "receptor del TGF-b" o "receptor del TGF-beta" o "TGF β R" se usa para abarcar los tres subtipos de la familia del TGF β R (es decir, TGF β R1, TGF β R2, TGF β R3). Los receptores del TGF β se caracterizan por la actividad de serina/treonina quinasa y existen en varias isoformas diferentes que pueden ser homo o heterodiméricas.

[0184] Modulador de la ruta de señalización del TGF β o modulador del TGF β : Como se usa en la presente descripción, el término "modulador de la ruta de señalización del TGF β " o "modulador del TGF β ", como se usa indistintamente en la presente descripción, se refiere a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) que es capaz de modular la vía de señalización del TGF β (por ejemplo, que tiene una inhibición, efecto de bloqueo o neutralización), que puede unirse al propio TGF β o puede unirse a un receptor del TGF β en las células. En cualquier caso, el modulador inhibe la vía de señalización del TGF β (por ejemplo, al unirse a la citocina (es decir, TGF β) en sí misma) o al unirse al receptor del TGF β . Por lo tanto, este término abarca ambos tipos de moduladores, los que se unen al TGF β y los que se unen al receptor del TGF β . En diversas modalidades descritas

en la presente descripción, un modulador de la ruta de señalización del TGF β se expresa junto con un receptor de antígeno quimérico en una célula inmunitaria modificada (por ejemplo, un linfocito T CAR). Los linfocitos T CAR que expresan dicho modulador de la ruta de señalización del TGF β se denominan en la presente descripción como linfocitos T CAR blindados con TGF β .

[0185] *Tratar o tratamiento:* Como se usa en la presente descripción, el término “tratar” o “tratamiento” se define como la administración de un agente terapéutico a un sujeto, por ejemplo, un paciente, o la administración, por ejemplo, mediante aplicación, a un tejido o una célula aislados de un sujeto que se devuelven al sujeto. En algunas modalidades, el agente terapéutico es un linfocito T CAR blindado (por ejemplo, un linfocito T CAR manipulado por ingeniería genética que coexpresa un modulador del TGF β). El tratamiento puede ser para curar, cicatrizar, aliviar, alterar, remediar, mejorar, paliar, mejorar o afectar el trastorno, los síntomas del trastorno o la predisposición al trastorno, por ejemplo, un cáncer. Aunque no se desea limitarse a la teoría, se cree que el tratamiento provoca la inhibición, ablación o destrucción de una célula in vitro o in vivo, o la reducción de otra manera de la capacidad de una célula, por ejemplo, una célula aberrante, de mediar un trastorno, por ejemplo, un trastorno como se describe en la presente (por ejemplo, un cáncer).

[0186] La invención descrita en la presente descripción se usa en una "cantidad efectiva" para el tratamiento terapéutico, profiláctico o preventivo. Una cantidad terapéuticamente efectiva de los linfocitos T CAR blindados (por ejemplo, células manipuladas por ingeniería genética que coexpresan un modulador de señalización de CAR y TGF β) descritas en la presente descripción es una cantidad efectiva para mejorar o reducir uno o más síntomas de, o para prevenir o curar, la enfermedad (por ejemplo, cáncer).

[0187] *Región o dominio variable:* Como se usa en la presente descripción, las expresiones “región variable” o “dominio variable” de un anticuerpo hacen referencia a los dominios de extremo amino de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera pueden denominarse “VH” y “VL”, respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes más variables del anticuerpo (con respecto a otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión a antígenos. Los anticuerpos solo de cadena pesada tienen una sola región variable de cadena pesada.

[0188] Vector: Como se usa en la presente descripción, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales pueden ligarse al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedera tras su introducción en la célula hospedera, y por lo tanto se replican junto con el genoma del hospedero. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Esos vectores se denominan en la presente “vectores de expresión”.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE DETERMINADAS MODALIDADES

[0189] La presente invención proporciona métodos y composiciones para mejorar la respuesta inmunitaria frente a cánceres y patógenos mediante el uso de una célula inmunitaria modificada (por ejemplo, un linfocito T CAR) blindada con un polipéptido que modula la señalización del TGF β . La presente invención no se limita a métodos particulares ni las condiciones experimentales descritas, ya que esos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción tiene el fin solamente de describir modalidades particulares, y no se pretende que sea limitante a menos que se indique, dado que el alcance de la presente invención quedará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

Señalización del TGF-B/SMAD

[0190] El factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β) es una citocina multifuncional originalmente nombrada por su capacidad para transformar fibroblastos normales en células capaces de un crecimiento independiente del anclaje. La señalización del TGF- β controla muchas funciones celulares clave, que incluye la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, la migración y la transición mesenquimatosa epitelial. Regula diversos procesos biológicos, como la formación de matriz extracelular, la cicatrización de heridas, el desarrollo embrionario, el desarrollo óseo, la hematopoyesis, las respuestas inmunitarias e

inflamatorias y la transformación maligna. La desregulación del TGF- β conduce a condiciones patológicas, por ejemplo, defectos de nacimiento, cáncer, inflamación crónica y enfermedades autoinmunes y fibróticas.

[0191] El TGF- β , producido principalmente por células hematopoyéticas y tumorales, puede regular, es decir, estimular o inhibir, el crecimiento y la diferenciación de células de una variedad de tejidos tanto normales como neoplásicos (Sporn y otros, Science, 233: 532 (1986)) y estimular la formación y elaboración de diversos elementos estromales. El TGF- β está implicado en muchos procesos celulares proliferativos y no proliferativos, como la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la formación de matriz extracelular, el desarrollo óseo, la cicatrización de heridas, la hematopoyesis y las respuestas inmunitarias e inflamatorias.

[0192] El TGF- β también posee actividades inmunosupresoras, que incluyen inhibición del asesino activado por linfoquinas (LAK) y linfocitos T citotóxicos (CTL), disminución de la linfopoyesis de células B y expresión de cadenas ligeras kappa, regulación negativa de la hematopoyesis, regulación negativa de la expresión de HLA-DR sobre las células tumorales, y la inhibición de la proliferación de linfocitos B activados por antígeno en respuesta al factor de crecimiento de linfocitos B. Muchos tumores humanos y muchas líneas de células tumorales producen TGF- β lo que sugiere un posible mecanismo para que esos tumores evadan la vigilancia inmunológica normal. Esta inmunomodulación negativa, junto con las observaciones de que ciertas líneas celulares transformadas han perdido la capacidad de responder al TGF- β de forma autocrina y que el TGF- β estimula la formación de estroma y disminuye la vigilancia inmunitaria del tumor, sugiere modelos atractivos para la desregulación y proliferación de neoplasias.

[0193] Dado que la señalización del TGF- β es importante tanto para las células sanas como para la regulación del cáncer, dirigirse sistémicamente al TGF- β puede causar efectos secundarios no deseados. En cuanto al cáncer específicamente, se conoce que los miembros del TGF- β de la familia tienen una serie de actividades biológicas relacionadas con la tumorigénesis (que incluye la angiogénesis) y la metástasis. El TGF- β inhibe la proliferación de muchos tipos de células, que incluye las células endoteliales capilares y las células del músculo liso. El TGF- β regula a la baja la expresión de integrina ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 3\beta 1$ involucradas en la migración de células endoteliales). Las integrinas están involucradas en la migración de todas las células, que incluye las metastásicas. El

TGF- β regula a la baja la expresión de la metaloproteinasa de matriz necesaria tanto para la angiogénesis como para la metástasis. El TGF- β induce el inhibidor del activador del plasminógeno, que inhibe una cascada de proteinasa necesaria para la angiogénesis y la metástasis. El TGF- β induce a las células normales a inhibir las células transformadas. Ver, por ejemplo, Yingling y otros, Nature Reviews, 3(12): 1011-1022 (2004), que revela que la desregulación del TGF- β ha estado implicada en la patogenia de una variedad de enfermedades, que incluye el cáncer y la fibrosis, y presenta la justificación para evaluar inhibidores de señalización del TGF- β como terapias contra el cáncer, biomarcadores/diagnósticos, las estructuras de los inhibidores de molécula pequeña que están en desarrollo y el modelo de descubrimiento de fármacos dirigidos que se está aplicando a su desarrollo.

[0194] Como se usa en la presente descripción, el término "ruta de señalización del TGF- β " se usa para describir los eventos de señalización aguas abajo atribuidos a ligandos similares a TGF- β y TGF- β . Por ejemplo, en una ruta de señalización, un ligando del TGF- β se une a un receptor del TGF- β de tipo II y lo activa. El receptor del TGF- β Tipo II recluta y forma un heterodímero con un receptor del TGF- β Tipo I. El heterodímero resultante permite la fosforilación del receptor de tipo I, que a su vez fosforila y activa un miembro de la familia de proteínas SMAD. Se desencadena una cascada de señalización, que es bien conocida por los expertos en la materia, y finalmente conduce al control de la expresión de mediadores implicados en el crecimiento celular, la diferenciación celular, la tumorigénesis, la apoptosis y la homeostasis celular, entre otros. También se contemplan otras rutas de señalización del TGF- β para la manipulación de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción.

Moduladores de vías de señalización del TGF- β

[0195] La presente invención proporciona un sistema inmunomodulador que comprende moduladores de señalización del TGF- β (por ejemplo, polipéptidos que modulan secuencias de señalización del TGF- β o de ácido nucleico que codifican polipéptidos que modulan la señalización del TGF- β). En algunas modalidades, los moduladores de señalización del TGF- β provocan una reacción celular al unirse a TGF- β o al receptor del TGF- β . En algunas modalidades, los moduladores de señalización del TGF- β son secretados por una célula.

[0196] En varias modalidades, la presente invención proporciona células inmunitarias modificadas (por ejemplo, linfocitos T) que expresan un receptor de antígeno quimérico junto

con un modulador de señalización del TGF- β . Tal modulador puede unirse a TGF- β sí mismo o a receptores del TGF- β . Los linfocitos T CAR que expresan dichos moduladores se denominan en la presente descripción como linfocitos T CAR blindados con TGF- β .

Moléculas de unión a antígeno anti-TGF β y anti-TGF β R2

5 **[0197]** En algunas modalidades, el TGF- β los moduladores de señalización son moléculas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos). En algunas modalidades, las moléculas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos) se unen específicamente al TGF- β . En algunas modalidades, las moléculas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos o
10 fragmentos de unión a antígeno de los mismos) se unen específicamente al receptor de TGF- β (TGF β R) (por ejemplo, TGF β R1, TGF β R2).

[0198] Los moduladores de señalización del TGF- β (por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-TGF β o una molécula de anticuerpo anti-TGF β R) pueden comprender todos, o un subconjunto de unión a antígeno de las CDR o la cadena pesada, descritos en la
15 presente descripción. En la Tabla 1 se muestran ejemplos de secuencias de aminoácidos de agentes de unión a antígeno anti-TGF β o anti-TGF β R2 descritos en la presente descripción, que incluye las regiones variables. También se describen anticuerpos anti-TGF β o anti-TGF β R2 adicionales en las Patentes de Estados Unidos núms. 7,723,486 y 9,783,604; Publicaciones de Solicitudes de Patentes de Estados Unidos núms.
20 US20160017026A1 y US20180105597, US20190119387; y Solicitudes de Patente Internacional núms. WO2012093125A1, WO2011/012609, WO 2017/141208 A1; la totalidad de cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia. Los agentes de unión a antígenos útiles en el sistema de modulación inmunitaria descrito en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos bivalentes
25 como (Fab')₂, fragmentos monovalentes como Fab, anticuerpos monocatenarios, Fv monocatenarios (scFv), monodominios anticuerpos, anticuerpos monocatenarios multivalentes, diacuerpos, triacuerpos y similares que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, un epítipo TGF β R).

[0199] En algunas modalidades, el sistema inmunomodulador comprende un modulador de
30 señalización del TGF- β (por ejemplo, un agente de unión a antígeno anti-TGF β o anti-TGF β R2) que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia proporcionada en la Tabla 1. En algunas modalidades,

el sistema inmunomodulador comprende un modulador de señalización del TGF- β que comprende una o más secuencias CDR de un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en la Tabla 1. En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF- β de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia VH proporcionada en la Tabla 1. En algunas modalidades, el VH del modulador de señalización del TGF- β es un anticuerpo de dominio único (VH).

[0200] En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF- β comprende una secuencia líder. En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF- β es un monómero. En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF- β es un dímero. En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF- β es un trímero.

[0201] En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF- β comprende un enlazador para conectar dominios en tándem. En algunas modalidades, el enlazador comprende GGGGS (SEQ ID NO: 59). En algunas modalidades, el enlazador comprende (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 59), donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, el enlazador comprende GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 61).

[0202] En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF- β comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia VL proporcionada en la Tabla 1. En algunas modalidades, los agentes de unión a antígenos anti-TGF β de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada idéntica a una secuencia VH proporcionada en la Tabla 1.

[0203] En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF- β de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia VH proporcionada en la Tabla 1. En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF- β de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada idéntica a una secuencia VH proporcionada en la Tabla 1.

[0204] En algunas modalidades, la VH del modulador de señalización del TGF- β (por ejemplo, anticuerpo de un solo dominio) comprende una secuencia líder proporcionada que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % en la Tabla 1.

En algunas modalidades, el agente de unión a antígenos anti-TGF β vH (por ejemplo, anticuerpo de un solo dominio) comprende una secuencia líder proporcionada en la Tabla 1.

Tabla 1. Moléculas de unión a antígeno anti-TGF β y anti-TGF β R2 ilustrativas

SEQ ID NO	Secuencia
SEQ ID NO: 1 TGFb scFv VH-VL1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAP GGGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELS SLRSEDNAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGGS GGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSL GSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKR
SEQ ID NO: 2 TGFb scFv VH-VL2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAP GGGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELS SLRSEDNAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGGS GGGGSGGGGSETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKR
SEQ ID NO: 3 TGFb scFv VL-VH	ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYADSPITFGQGTRLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGL EWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 4 TGFbR2 scFv VH- VL	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWRQP PGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRTISIDTSKSKQFSLKLSS VTAADNAVYYCPRGPTMIRGVDSWGQGTLVTVSSGGGGGS GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 5 TGFbR2 scFv VL-VH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WY QQKPGQ APRLLIYDASN RAT GIPARFSGSGSGTDFTLT ISS LEPEDFAVY YCQQRSNWPPTFGQG TK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSQLQV QESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWG WIR QPPGKG LEWIGSFYYGEKTYYNPSL KSR ATISIDTSK SQ FS LK LSSVTAA DTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 6 mTGFbR2 VH1	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLS CA ASGFTFTTYGMGWVRQAP GKGLEWVSWIEKTGNKTY YAD SVKGRFTISRDN SKNT LYLQM NSLRAEDTAVYYCAKARHIK VRS RDFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 7	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLS CA ASGFTFTTYGMGWVRQAP GKGLEWVSWIEKTGNKTY YAD SVKGRFTISRDN SKNT LYLQM NSLRAEDTAVYYCAKAG R HIK VRS RDFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 8 hTGFbR2 VH1	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLS CA ASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQ GTLVTVSS
SEQ ID NO: 9	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLS CA ASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggs EVQLLES GG GLVQPGGSLRLS CA ASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 10	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLS CA ASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggs ggggsEVQLLES GG GLVQPGGSLRLS CA ASGFTFGTEQMWWV RQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LY LQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVS S

SEQ ID NO: 11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSGGGS EPKSsDKHTHTCPPCgggssgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
SEQ ID NO: 12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSGGGS EPKSsDKHTHTCPPCgggssgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGggggsggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQ MWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQG TLVTVSS
SEQ ID NO: 13	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSgggss gggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 14	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSgggss gggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsEVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSR IDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV

	YYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 15	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggs EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggs EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 16	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggs EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggs EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSSEVQL LES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKG LEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggsggg gsEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQ APGKGLFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSgg ggsggggsEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMW

	WVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO: 17	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAP GQGLEWMGGVPIVDIAN YAQRFKGRVTITADESTSTTYMELS SLRSED TAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVT VSSGGGGGS GGGGSGGGGSALET VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSL GSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKggggsQVQ LVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGL EWMGGVPIVDIAN YAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGS GGGGSALET VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 18	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAP GQGLEWMGGVPIVDIAN YAQRFKGRVTITADESTSTTYMELS SLRSED TAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVT VSSGGGGGS GGGGSGGGGSALET VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSL GSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKggggsgggg sQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAP GQGLEWMGGVPIVDIAN YAQRFKGRVTITADESTSTTYMELS SLRSED TAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVT VSSGGGGGS GGGGSGGGGSALET VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSL GSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 19	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAP GQGLEWMGGVPIVDIAN YAQRFKGRVTITADESTSTTYMELS SLRSED TAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVT VSSGGGGGS GGGGSGGGGSALET VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSL

	GSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKGGSEPKS sDKTHTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 20	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAP GQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELS SLRSEDVAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTTLTVSSGGGGGS GGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSL GSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKGGSEPKS sDKTHTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggg gsggsQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVR QAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYM ELSSLRSEDVAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTTLTVSSGGG GSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQ SLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAP GQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELS SLRSEDVAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTTLTVSSGGGGGS GGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSL GSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKgggssgggs gGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAP GQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELS

	SLRSEDNAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTTLTVTVSSGGGGGS GGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSL GSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKgggssgggs gGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsQVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPI VDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDNAVYYCA STLGLVLDAMDYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAL ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYADSPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 23	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIWQP PGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRTISIDTSKSQFSLKLSS VTAADNAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTTLTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKgggggQLQVQES GPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIWQPPGKGLEW IGSFYYGEKTYYNPSLKSRTISIDTSKSQFSLKLSSVTAADNAV YYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFA VYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 24	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIWQP PGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRTISIDTSKSQFSLKLSS VTAADNAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTTLTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKggggsggggsQLQ VQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIWQPPGK

	GLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSSVTA ADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVT VSSGGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEP EDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 25	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWG WIRQP PGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSS VTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVT VSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKGGSEPKSsDKT HTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 26	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWG WIRQP PGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSS VTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVT VSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKGGSEPKSsDKT HTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggs QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWG WIRQP PGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSS VTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVT VSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 27	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWG WIRQP PGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSS

	VTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKgggssggsgGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 28	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWRQP PGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRAATISIDTSKSQFSLKLSS VTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKgggssggsgGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsQLQVQESGPGLVKPSE TLTCTVSGGSISNSYFSWGWRQPPGKGLEWIGSFYYGEK TYYNPSLKSRAATISIDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPT MIRGVIDSWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS PATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRS NWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 29	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGQESMYWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKSGTRIKQGF DYWGQGT LTVTVSS
SEQ ID NO: 30	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAP GKGLEWVSAIEPIGHRTYYANSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGT LTVTVSS
SEQ ID NO: 31	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTDQMWWVRQA PGKGLEFVSRIDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKRQPAGVSGKYVDYWGQGT LTVTVSS

[0205] En algunas modalidades, el agente de unión al antígeno anti-TGF β o anti-TGF β R es un anticuerpo. La unidad estructural de anticuerpos de mamíferos de origen natural se tipifica con un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares de cadenas polipeptídicas, donde cada par tiene una cadena “ligera” (alrededor de 25 kDa) y una cadena “pesada” (alrededor de 50-70 kDa). La parte de extremo amino de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La parte de extremo carboxi de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas pueden clasificarse como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas pueden clasificarse como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definir el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen mediante una región “J” de alrededor de 12 o más aminoácidos, donde la cadena pesada también incluye una región “D” de alrededor de 10 aminoácidos más. Ver generalmente, *Fundamental Immunology*, cap. 7 (Paul, W., ed., 2^a ed. Raven Press, NY (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Los isotipos preferentes para las moléculas de anticuerpos anti-GCC son inmunoglobulinas IgG, que pueden clasificarse en cuatro subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que tienen diferentes cadenas pesadas gamma. La mayoría de los anticuerpos terapéuticos son anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados del tipo IgG1. En una modalidad particular, la molécula de anticuerpo anti-TGF β tiene el isotipo IgG1.

[0206] Las regiones variables de cada par de cadena ligera y pesada forman el sitio de unión al antígeno. Por lo tanto, un anticuerpo de IgG intacto tiene dos sitios de unión que son iguales. Sin embargo, los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos son construcciones híbridas artificiales que tienen dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes, lo que da como resultado dos sitios de unión diferentes.

[0207] Todas las cadenas presentan la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones de determinación de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, lo que permite la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y

FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de secuencias de Kabat de proteínas de interés inmunológico (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Chothia et ál. *Nature* 342: 878-883 (1989). Como se usa en la presente descripción, las CDR hacen referencia de acuerdo con Kabat a cada una de las cadenas pesadas (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y ligeras (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

[0208] Por lo tanto, en una modalidad, la molécula de anticuerpo incluye uno o ambos de:

[0209] (a) una, dos, tres o un número de unión a antígeno de CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3) de uno de los anticuerpos de hibridoma humano, linfocito seleccionado o murino mencionados anteriormente. En modalidades, la o las CDR pueden comprender una secuencia de aminoácidos de una o más o todas las LCDR1-3 de la siguiente manera: LCDR1, o LCDR1 modificada en donde de uno a siete aminoácidos se sustituyen de manera conservadora) LCDR2, o LCDR2 modificada en donde uno o dos aminoácidos se sustituyen de manera conservadora); o LCDR3, o LCDR3 modificada en donde uno o dos aminoácidos se sustituyen de manera conservadora; y

[0210] (b) una, dos, tres o un número de unión a antígeno de CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3) de uno de los anticuerpos de hibridoma humano, linfocito seleccionado o murino mencionados anteriormente. En modalidades, la o las CDR pueden comprender una secuencia de aminoácidos de una o más o todas las HCDR1-3 de la siguiente manera: HCDR1, o HCDR1 modificada en donde uno o dos aminoácidos se sustituyen de manera conservadora; HCDR2, o HCDR2 modificada en donde de uno a cuatro aminoácidos se sustituyen de manera conservadora; o HCDR3, o HCDR3 modificada en donde uno o dos aminoácidos se sustituyen de manera conservadora.

[0211] En algunas modalidades, una molécula de anticuerpo anti-TGF β o una molécula de anticuerpo anti-TGF β R (por ejemplo, un anti-TGF β R2) de la invención puede extraer citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) a una célula que exprese TGF β , por ejemplo, una célula tumoral. Los anticuerpos con los isotipos IgG1 e IgG3 son útiles para provocar la función efectora en una capacidad citotóxica dependiente de anticuerpos, debido a su capacidad de unirse al receptor Fc. Los anticuerpos con los isotipos IgG2 e IgG4 son útiles para minimizar una respuesta de ADCC debido a su baja capacidad de unirse al receptor Fc. En modalidades relacionadas, pueden realizarse sustituciones en la región Fc o cambios en la composición de glicosilación de un anticuerpo, por ejemplo,

mediante el crecimiento en una línea celular eucariota modificada, para mejorar la capacidad de los receptores de Fc de reconocer, unirse y/o mediar la citotoxicidad de las células a las que se unen los anticuerpos anti-TGF β o anti-TGF β R (por ejemplo, un anti-TGF β R2) (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos núm. 7,317,091, 5,624,821 y publicaciones que incluyen el documento WO 00/42072, Shields y otros. *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001), Lazar y otros. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 :4005-4010 (2006), Satoh y otros. *Expert Opin Biol. Ther.* 6: 1161-1173 (2006)). En determinadas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo de origen humano, anticuerpo humano) puede incluir sustituciones o remplazos de aminoácidos que alteren o personalicen la función (por ejemplo, función efectora). Por ejemplo, una región constante de origen humano (por ejemplo, región constante γ 1, región constante γ 2) puede diseñarse para reducir la activación del complemento y/o la unión al receptor Fc. (Ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos núm. 5,648,260 (Winter y otros), la Patente de Estados Unidos núm. 5,624,821 (Winter y otros) y la Patente de Estados Unidos núm. 5,834,597 (Tso y otros), cuyas enseñanzas se incorporan a la presente descripción mediante referencia). Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de una región constante de origen humano que contiene esas sustituciones o remplazos de aminoácidos es al menos alrededor de 95 % idéntica en toda la longitud a la secuencia de aminoácidos de la región constante no alterada de origen humano, con mayor preferencia al menos alrededor de 99 % idéntica en toda la longitud a la secuencia de aminoácidos de la región constante no alterada de origen humano. Las moléculas de unión a antígenos anti-TGF β adicionales se describen además en la Patente de Estados Unidos núm. 8,785,600 (Nam y otros), cuyas enseñanzas se incorporan a la presente descripción mediante referencia.

[0212] Aún en otra modalidad, las funciones efectoras también pueden alterarse mediante la modulación del patrón de glicosilación del anticuerpo. Por alteración se entiende la eliminación de uno o más restos de carbohidratos encontrados en el anticuerpo, y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos con actividades de ADCC mejoradas con una estructura de carbohidratos maduros que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos núm. 2003/0157108 (Presta). Ver también la publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos núm. 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Glycofi también ha desarrollado líneas

celulares de levadura capaces de producir glicoformas específicas de anticuerpos.

[0213] De manera adicional o alternativa, puede elaborarse un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras de GlcNac bisecantes aumentadas. Se ha demostrado que esos patrones de glucosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Esas modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula hospedera con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y pueden usarse como células hospederas en las que se modifiquen genéticamente para expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir así un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1,176,195 de Hang y otros, describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de forma tal que los anticuerpos expresados en esa línea celular presentan hipofucosilación. La publicación del documento PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida de unir fucosa a carbohidratos ligados a Asn(297), lo que también de como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedera (ver también Shields, R. L. y otros, 2002 *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740). La publicación del documento PCT WO 99/54342 de Umana y otros, describe líneas celulares modificadas para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de forma tal que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas presentan estructuras de GlcNac bisecantes que dan como resultado un aumento de la actividad de ADCC de los anticuerpos (ver también Umana y otros, 1999 *Nat. Biotech.* 17: 176-180).

[0214] Los anticuerpos humanizados también pueden elaborarse mediante el uso de un enfoque de injerto de CDR. Las técnicas de generación de esos anticuerpos humanizados se conocen en la técnica. Generalmente, los anticuerpos humanizados se producen mediante la obtención de secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias ligeras variables y pesadas de un anticuerpo que se une al TGF β , la identificación de la región de determinación complementaria o “CDR” en las secuencias ligeras variables y pesadas variables y el injerto de las secuencias de ácido nucleico de CDR en las secuencias de ácido nucleico marco humanas. (Ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos núms.

4,816,567 y 5,225,539). La ubicación de las CDR y los residuos del marco puede determinarse (ver, Kabat, E. A., y otros (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación NIH núm. 91-3242, y Chothia, C. y otros. *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)).

[0215] En algunas modalidades, el sistema inmunomodulador de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo anti-TGF β o anti-TGF β R que comprende una CDR de una molécula de anticuerpo descrita en la Tabla 1. En algunas modalidades, las secuencias de las Tablas 1 pueden incorporarse en moléculas que reconocen TGF β o TGF β R para su uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente descripción (por ejemplo, el sistema de modulación inmunitaria, células inmunosensibles o métodos de tratamiento que comprenden los mismos). El marco humano seleccionado es el adecuado para la administración in vivo, lo que significa que no presenta inmunogenia. Por ejemplo, esa determinación puede realizarse mediante experiencia previa con el uso in vivo de esos anticuerpos y estudios de similitudes de aminoácidos. Una región marco adecuada puede seleccionarse de un anticuerpo de origen humano que tiene al menos alrededor de 65 % de identidad de secuencia de aminoácidos, y preferentemente al menos alrededor de 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos dentro de la longitud de la región marco dentro de la secuencia de aminoácidos de la parte equivalente (por ejemplo, región marco) del anticuerpo donante, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-TGF β . La identidad de secuencia de aminoácidos puede determinarse mediante el uso de un algoritmo de alineación de secuencia de aminoácidos adecuado, tal como CLUSTAL W, mediante el uso de los parámetros predeterminados. (Thompson J. D. y otros, *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680 (1994).)

[0216] Una vez que se identifican las CDR y FR del anticuerpo clonado que se va a humanizar, se identifican las secuencias de aminoácidos que codifican las CDR y las secuencias de ácido nucleico correspondientes injertadas en FR humanas seleccionadas. Esto puede hacerse mediante el uso de cebadores y enlazadores conocidos, cuya selección se conoce en la técnica. Todas las CDR de un anticuerpo humano particular pueden remplazarse con al menos una parte de una CDR no humana o solo algunas de las CDR pueden remplazarse con CDR no humanas. Solo es necesario remplazar la cantidad de CDR necesarias para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

Después de que las CDR se injertan en FR humanas seleccionadas, las secuencias ligeras variables y pesadas variables “humanizadas” resultantes se expresan para producir un Fv humanizado o anticuerpo humanizado que se une al TGF β o al TGF β R. Preferentemente, el anticuerpo con injerto de CDR (por ejemplo, humanizado) se une a un TGF β o un TGF β R con una afinidad similar, sustancialmente igual o mejor que la del anticuerpo donante. Típicamente, las secuencias pesadas y ligeras variables humanizadas se expresan como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humanas de forma tal que se obtiene un anticuerpo intacto que se une al TGF β . Sin embargo, puede producirse un anticuerpo Fv humanizado que no contiene las secuencias constantes.

[0217] Dentro del alcance de la invención también se encuentran anticuerpos humanizados en los que se han sustituido, eliminado o agregado aminoácidos específicos. En particular, los anticuerpos humanizados pueden tener sustituciones de aminoácidos en la región marco, tal como para mejorar la unión al antígeno. Por ejemplo, una pequeña cantidad seleccionada de residuos de marco de aceptación de la cadena de inmunoglobulina humanizada puede remplazarse por los aminoácidos donantes correspondientes. Las localizaciones de las sustituciones incluyen residuos de aminoácidos adyacentes a la CDR, o que son capaces de interactuar con una CDR (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 5,585,089 o 5,859,205). El marco de aceptación puede ser una secuencia de marco de anticuerpos humanos maduros o una secuencia de consenso. Como se usa en la presente descripción, el término “secuencia de consenso” se refiere a la secuencia que se encuentra con más frecuencia, o que se diseña a partir de los residuos más comunes en cada posición en una secuencia en una región entre miembros de la familia relacionados. Hay una serie de secuencias de consenso de anticuerpos humanos disponibles, que incluyen secuencias de consenso para los diferentes subgrupos de regiones variables humanas (ver, Kabat, E. A., y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Oficina de Impresión del Gobierno de los Estados Unidos (1991)). La base de datos de Kabat y sus aplicaciones están disponibles en línea, por ejemplo, a través de IgBLAST en el Centro Nacional de Información Biotecnológica, Bethesda, Md. (véase también Johnson, G. y Wu, T. T., *Nucleic Acids Research* 29: 205-206 (2001)).

[0218] En determinadas modalidades, la molécula de anticuerpo de TGF β o el TGF β R es un anticuerpo de IgG1 anti-TGF β o anti-TGF β R humano. Dado que esos anticuerpos

poseen la unión deseada a la molécula de TGF β o de TGF β R, cualquiera de esos anticuerpos puede conmutarse fácilmente por isotipo para generar un isotipo de IgG4 de ser humano, por ejemplo, y mantener la misma región variable (que define la especificidad y afinidad del anticuerpo, en una cierta medida). En consecuencia, a medida que se generan

5 candidatos a anticuerpos que cumplen con los atributos “estructurales” deseados como se describió anteriormente, generalmente se les pueden proporcionar al menos determinados atributos “funcionales” adicionales que se deseen a través del cambio de isotipo.

Anticuerpos monocatenarios

[0219] Los anticuerpos monocatenarios carecen de algunos o todos los dominios constantes de los anticuerpos completos de los que derivan. Por lo tanto, pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos completos. Por ejemplo, los anticuerpos monocatenarios tienden a estar libres de determinadas interacciones no deseadas entre las regiones constantes de cadena pesada y otras moléculas biológicas. Además, los anticuerpos monocatenarios son considerablemente más pequeños que los

15 anticuerpos completos y pueden tener una mayor permeabilidad que los anticuerpos completos, lo que permite que los anticuerpos monocatenarios se localicen y se unan a los sitios de unión al antígeno diana de manera más eficiente. Además, el tamaño relativamente pequeño de los anticuerpos monocatenarios hace que sea menos probable que provoquen una respuesta inmunitaria no deseada en un receptor que los anticuerpos completos.

[0220] En algunas modalidades, los moduladores de señalización del TGF β son moléculas de unión a antígeno monocatenario (por ejemplo, scFv) que se unen específicamente a TGF β . En algunas modalidades, los moduladores de señalización del TGF β son moléculas de unión a antígeno de cadena sencilla (por ejemplo, scFv) que se unen específicamente al receptor del TGF-B (TGF β R) (por ejemplo, TGF β R1, TGF β R2).

[0221] Múltiples anticuerpos monocatenarios, cada uno de los cuales tiene un dominio VH y uno VL unidos covalentemente por un primer conector peptídico, pueden unirse covalentemente por al menos uno o más conectores peptídicos para formar anticuerpos monocatenarios multivalentes, que pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos. Cada cadena de un anticuerpo monocatenario multivalente incluye un fragmento de cadena ligera variable y un fragmento de cadena pesada variable, y está unida por un conector peptídico

30 a al menos otra cadena. El conector peptídico está compuesto por al menos quince residuos de aminoácidos. El número máximo de residuos de aminoácidos enlazadores es de

aproximadamente cien.

[0222] Pueden combinarse dos anticuerpos monocatenarios para formar un diacuerpo, también conocido como dímero bivalente. Los diacuerpos tienen dos cadenas y dos sitios de unión, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Cada cadena del diacuerpo incluye un dominio VH conectado a un dominio VL. Los dominios están conectados con enlazadores que son lo suficientemente cortos como para evitar el emparejamiento entre dominios en la misma cadena, por lo tanto, impulsa el emparejamiento entre dominios complementarios en diferentes cadenas para recrear los dos sitios de unión a antígeno.

[0223] Pueden combinarse tres anticuerpos de cadena sencilla para formar triacuerpos, también conocidos como trímeros trivalentes. Los triacuerpos se construyen con el aminoácido terminal de un dominio VL o VH fusionado directamente con el carboxilo terminal de un dominio VL o VH, es decir, sin ninguna secuencia conectora. El triacuerpo tiene tres cabezas Fv con los polipéptidos dispuestos de forma cíclica, de cabeza a cola. Una posible conformación del triacuerpo es plana con los tres sitios de unión ubicados en un plano en un ángulo de 120 grados entre sí. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o triespecíficos.

Anticuerpos de un solo dominio

[0224] Los anticuerpos de un solo dominio (sdAb) son diferentes de los anticuerpos convencionales de 4 cadenas al tener un único dominio variable de anticuerpo monomérico. Por ejemplo, los camélidos y los tiburones producen sdAb llamados anticuerpos solo de cadena pesada (HcAb), que naturalmente carecen de cadenas ligeras. El fragmento de unión al antígeno en cada brazo de los anticuerpos solo de cadena pesada de camélidos tiene un solo dominio variable de cadena pesada (VHH), que puede tener afinidad alta con un antígeno sin la ayuda de una cadena ligera. El VHH de camélido se conoce como el fragmento de unión al antígeno funcional más pequeño con un peso molecular de aproximadamente 15 kD.

[0225] Un aspecto de la presente solicitud proporciona anticuerpos de un solo dominio aislados (denominados en la presente descripción como “sdAb anti-TGFβR”) que se unen específicamente al TGFβR, tal como el TGFβR2 humano. En algunas modalidades, el sdAb anti-TGFβR modula la actividad del TGFβ. En algunas modalidades, el sdAb anti-TGFβ es un anticuerpo antagonista. Se proporcionan además fragmentos de unión a antígenos derivados de cualquiera de los sdAb anti-TGFβR descritos en la presente descripción, y

proteínas de unión al antígeno que comprenden cualquiera de los sdAb anti-TGFβR descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el sdAb anti-TGFβR comprende una, dos y/o tres secuencias de CDR proporcionadas en la Tabla 1. En la Tabla 1 se proporcionan sdAb anti-TGFβR ilustrativos.

5 **[0226]** En algunas modalidades, algunas o todas las secuencias de CDR de la cadena pesada, pueden usarse en otro agente de unión a antígenos, por ejemplo, en una molécula de anticuerpo quimérico, humanizado, injertado en CDR. Las modalidades incluyen una molécula de anticuerpo que comprende CDR suficientes, por ejemplo, las tres CDR de una de la región variable de cadena pesada mencionada anteriormente, para permitir la unión al
10 TGFβ.

[0227] En algunas modalidades, las CDR, por ejemplo, todas las HCDR, se incorporan en una región o regiones marco humanas o derivadas de seres humanos. Los ejemplos de regiones marco humanas incluyen secuencias marco de la línea germinal humana, secuencias de la línea germinal humana que han madurado por afinidad (ya sea in vivo o in
15 vitro), o secuencias humanas sintéticas, por ejemplo, secuencias de consenso. En una modalidad el marco de cadena pesada es un marco de IgG1 o IgG2.

[0228] En algunas modalidades, los moduladores del TGFβ de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 1. En algunas modalidades, los agentes de unión a antígenos
20 anti-TGFβ son anticuerpos de un solo dominio solamente de cadena pesada (por ejemplo, agentes de unión a antígenos que no comprenden una cadena ligera de inmunoglobulina).

[0229] Los fragmentos de anticuerpos para uso terapéutico o diagnóstico in vivo pueden beneficiarse de modificaciones que mejoran sus semividas séricas. Los restos orgánicos adecuados destinados a aumentar la semivida sérica in vivo del anticuerpo pueden incluir
25 uno, dos o más restos lineales o ramificados seleccionados de un grupo polimérico hidrófilo (por ejemplo, un polímero lineal o ramificado (por ejemplo, un polialcanoglicol tal como polietilenglicol, monometoxi-polietilenglicol y similares), un carbohidrato (por ejemplo, un dextrano, una celulosa, un polisacárido y similares), un polímero de un aminoácido hidrófilo (por ejemplo, polilisina, poliaspartato y similares), óxido de polialcano y polivinilpirrolidona),
30 un grupo de ácidos grasos (por ejemplo, un ácido monocarboxílico o un ácido dicarboxílico), un grupo de ésteres de ácidos grasos, un grupo lipídico (por ejemplo, grupo de diacilglicerol, grupo de esfingolípidos (por ejemplo, ceramidilo)) o un grupo fosfolípido (por ejemplo, grupo

fosfatidil etanolamina). Preferentemente, el resto orgánico se une a un sitio predeterminado donde el resto orgánico no afecta la función (por ejemplo, no disminuye la afinidad de unión al antígeno) del inmunoconjugado resultante en comparación con el resto de anticuerpo no conjugado. El resto orgánico puede tener un peso molecular de alrededor de 500 Da a alrededor de 50 000 Da, preferentemente alrededor de 2000, 5000, 10 000 o 20 000 Da. Los ejemplos y métodos para modificar polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, con restos orgánicos pueden encontrarse, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos núm. 4,179,337 y 5,612,460, las publicaciones PCT núm. WO 95/06058 y WO 00/26256, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 20030026805.

10 *Dominio extracelular del TGFβR*

[0230] Los receptores del TGF-β contemplados para su uso en el sistema de modulación inmunitaria descritos en la presente descripción pueden ser cualquier receptor del TGF-β, incluidos los de la familia de quinasas similares a activina (ALK), la familia de proteínas morfogénicas óseas (BMP), la familia Nodal, el receptor de crecimiento y la familia de factores de diferenciación (GDF), y la familia de receptores del receptor TGF-β. Los receptores del TGF-β son receptores de serina/treonina quinasa que afectan varias vías de crecimiento y diferenciación en la célula. En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGFβ es un dominio extracelular recombinante (ECD) manipulado por ingeniería genética del receptor del TGFβ (por ejemplo, TGFβR1, TGFβR2). En algunas modalidades, el receptor del TGF-β útil para el sistema de modulación inmunitaria descrito en la presente descripción es un receptor del TGF-β de tipo II (por ejemplo, TGF-βR2).

[0231] En algunas modalidades, el modulador del TGFβ comprende un TGFβR proporcionado en la Tabla 2. En algunas modalidades, el modulador del TGFβ comprende una secuencia que es al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % idéntica a una secuencia proporcionada en la Tabla 2.

Tabla 2. Dominios extracelulares del TGFβR ilustrativos

SEQ ID NO: 32 mTGFβR2ECD (I24- K31,F57-L185)	IPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNS DVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCM SNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDP KLTYHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACN
--	---

	MEECNDYIIFSEEYTTSSPD
SEQ ID NO: 33 huTGFbR1+2 ECD v1	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNS MCIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDH CNKIELPTTVKSSPGLGPVEGGGGSTIPPHVQKSVN NDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSC MSNCSITSICEKPQEVCAVAVWRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCS SDECNDNIIFSEEYNTSNPD [hTGFbR1-ECD(L34-E125)- hTGFbR2-ECD(A44-D151)]
SEQ ID NO: 34 huTGFbR1+2 ECD v2	QCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNS MCIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDH CNGGGGSAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSN CSITSICEKPQEVCAVAVWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE CNDNIIFSE [hTGFbR1-ECD(Q35-N107)-4GS- 4GS-hTGFbR2-ECD(L34-E125)]
SEQ ID NO: 35 mTGFbR1+2 ECD v1	LQCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNS MCIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGAVTTTYCCNQDH CNKIELPTTGPFSEKQSAGLGPVELGGGGGSIPPHVP KSVNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDN QKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLET VCHDPKLTYHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFF MCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPD [mTGFbR1-ECD(L30-L126)-4GS-mTGFbR2-ECD(I24-K31,F57-D184)]
SEQ ID NO: 36 huTGFbR1+2 ECD v2	QCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNS MCIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGAVTTTYCCNQDH CNGGGGSAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSN CSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKL

	TYHGFTLEDAASPKCVMKE [mTGFbR1-ECD(Q31-N107)-4GS-mTGFbR2-ECD(I24-K31,F57-E150)]
SEQ ID NO: 37 Ratón TGFbR2 ECD con IgKss	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQ KDASIHLSNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQ LCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCV AVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYHGFTLEDAASPK CVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTT SSPDL
SEQ ID NO: 38 Dímero ECD TGFbR2 de ratón con enlazador 8(G4S) e IgKss con etiqueta de bandera	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQ KDASIHLSNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQ LCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCV AVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYHGFTLEDAASPK CVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTT SSPDLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSGGGSGGGGSIPPHVPKSDVEMEAQKDASIH LSNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFC DVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWR KNDKNITLETVCHDPKLTYHGFTLEDAASPKCVMKE KKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDLG GGGS DYKDDDDK

Receptores de Antígenos Quiméricos

[0232] En algunos aspectos, la presente invención proporciona un sistema inmunomodulador que comprende moduladores de señalización del TGF- β (por ejemplo, polipéptidos que modulan secuencias de señalización del TGF- β o de ácido nucleico que codifican polipéptidos que modulan la señalización del TGF- β) y un receptor de antígeno quimérico (CAR) que puede unirse a un antígeno de interés. Los CAR son moléculas híbridas que comprenden tres unidades esenciales: (1) un motivo de unión a antígeno extracelular, (2) motivos de unión/transmembrana y (3) motivos de señalización de linfocitos T intracelulares (Long A H, Haso W M, Orentas R J. Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor. Oncoimmunology. 2013; 2(4): e23621 En algunas

modalidades, los CAR de la presente invención comprenden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, un péptido señal o líder, un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y/o bisagra, un dominio coestimulador y un dominio intracelular. En algunas modalidades, los CAR son "CAR de primera generación", por ejemplo, incluyen aquellos que solo proporcionan señales de CD3 ζ tras la unión al antígeno, "CAR de segunda generación". Los CAR de "tercera generación" incluyen aquellos que proporcionan coestimulación (por ejemplo, CD28 o CD137) y activación (CD3 ζ). Los CAR de "tercera generación" incluyen aquellos que proporcionan coestimulación múltiple (por ejemplo, CD28 y CD137) y activación (CD3). En varias modalidades, el CAR se selecciona para que tenga alta afinidad o avidez por el antígeno.

[0233] El motivo de unión al antígeno de un CAR se crea comúnmente según el modelo de un fragmento variable monocatenario (ScFv), el dominio de unión mínimo de una molécula de inmunoglobulina (Ig) o un anticuerpo de un solo dominio (por ejemplo, documento WO2018/028647A1). También se han diseñado motivos alternativos de unión al antígeno, tales como ligandos receptores (es decir, la IL-13 se ha modificado para unirse al receptor de IL-13 expresado en el tumor), receptores inmunitarios intactos, péptidos derivados de bancos, y moléculas efectoras del sistema inmunitario innato (tales como NKG2D). También se desarrollan dianas celulares alternativas para la expresión de los CAR (como NK o linfocitos T gamma-delta) (Brown C E y otros. Clin Cancer Res. 2012; 18(8): 2199-209; Lehner M y otros. PLoS One. 2012; 7(2): e31210).

[0234] En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno de CAR es un fragmento variable de cadena única. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno de CAR es un anticuerpo de dominio único. En algunas modalidades, los CAR comprenden del extremo N-terminal al extremo C-terminal, un péptido señal o líder, vH, un dominio transmembrana y bisagra CD28, un dominio coestimulador CD28, y un dominio intracelular CD3 zeta.

[0235] Los motivos de unión de un CAR pueden ser un dominio estructural relativamente estable, tal como el dominio constante de IgG, o diseñarse para ser un enlazador flexible extendido. Los motivos estructurales, tales como los derivados de dominios constantes de IgG, pueden usarse para extender el dominio de unión a ScFv lejos de la superficie de membrana plasmática de linfocitos T. Esto puede ser importante para algunos objetivos tumorales donde el dominio de unión está particularmente cerca de la membrana de la

superficie celular del tumor (tal como para el disialogangliosido GD2; Orentas y otros, observaciones no publicadas). Hasta la fecha, los motivos de señalización usados en los CAR siempre incluyen la cadena CD3- ζ porque este motivo principal es la señal clave para la activación de los linfocitos T. Los primeros CAR de segunda generación informados

5 presentaron dominios de señalización CD28 y la secuencia transmembranaria CD28. Este motivo se usó en CAR de tercera generación que también contenían motivos de señalización de CD137 (4-1BB) (Zhao Y y otros. *J Immunol.* 2009; 183(9): 5563-74). Con la llegada de la nueva tecnología, la activación de los linfocitos T con microesferas unidas a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y la presencia de la “señal 2” canónica de CD28 ya no

10 era necesaria para la codificación por parte del propio CAR. Mediante la activación de microesferas, se descubrió que los vectores de tercera generación no eran superiores a los vectores de segunda generación en ensayos in vitro, y no proporcionaron ningún beneficio claro con respecto a los vectores de segunda generación en modelos de leucemia en ratones (Hao W, Lee D W, Shah N N, Stetler-Stevenson M, Yuan C M, Pastan I H, Dimitrov

15 D S, Morgan R A, FitzGerald D J, Barrett D M, Wayne A S, Mackall C L, Orentas R J. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, *Blood.* 2013; 121(7):1165-74; Kochenderfer J N y otros. *Blood.* 2012; 119(12): 2709-20). Esto se basa en el éxito clínico de los CAR específicos de CD19 que se encuentran en CD28/CD3- ζ de segunda generación (Lee D W y otros. American Society of Hematology

20 Annual Meeting. Nueva Orleans, La.; 7-10 de diciembre de 2013) y un formato de señalización CD137/CD3- ζ (Porter D L y otros. *N Engl J Med.* 2011; 365(8): 725-33). Además de CD137, otros miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, tales como OX40, también pueden proporcionar señales de persistencia importantes en linfocitos T transducidos con CAR (Yvon E y otros. *Clin Cancer Res.* 2009;

25 15(18): 5852-60). Igualmente importantes son las condiciones de cultivo en las que se cultivaron las poblaciones de linfocitos T CAR.

[0236] Las características de los CAR incluyen su capacidad para redirigir la especificidad y reactividad de los linfocitos T hacia una diana seleccionada de una manera no restringida por el MHC, y explotar las propiedades de unión al antígeno de los anticuerpos

30 monoclonales. El reconocimiento de antígenos no restringidos por el MHC les da a los linfocitos T que expresan los CAR la capacidad de reconocer el antígeno independientemente del procesamiento del antígeno, por tanto se evita un mecanismo

principal de escape del tumor. Además, cuando se expresan en los linfocitos T, los CAR ventajosamente no se dimerizan con cadenas alfa y beta del receptor de linfocitos T endógenos (TCR).

Dominio extracelular

- 5 **[0237]** Como se describe en la presente descripción, el CAR comprende un elemento de unión específico de la diana de otro modo denominado dominio o resto de unión a antígenos. La elección del dominio depende del tipo y la cantidad de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígenos puede elegirse para reconocer un ligando (por ejemplo, un antígeno de cáncer) que actúa como un marcador de
- 10 la superficie celular en células diana asociadas con un estado de enfermedad particular (por ejemplo, cáncer). Por lo tanto, los ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión al antígeno en el CAR incluyen aquellos asociados con infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunitarias y células cancerígenas.
- 15 **[0238]** En algunas modalidades, el dominio extracelular del CAR comprende un agente de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno cancerígeno. En determinadas modalidades, el CAR se une a un antígeno tumoral. Puede usarse cualquier antígeno tumoral (péptido antigénico) en las modalidades relacionadas con tumores descritas en la presente descripción. Las fuentes de antígeno incluyen, pero no se limitan a, proteínas
- 20 cancerígenas. El antígeno puede expresarse como un péptido o como una proteína intacta o una porción de esta. La proteína intacta o una porción de la misma puede ser nativa o mutagenizada. Los ejemplos no limitantes de antígenos tumorales incluyen anhidrasa carbónica IX (CA1X), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD8, CD7, CD 10, CD 19, CD20, CD22, CD30, CD33, CLL1, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f , CD56, CD74, CD133,
- 25 CD138, CD123, CD44V6, un antígeno de una célula infectada por citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, un antígeno de superficie celular), glicoproteína epitelial-2 (EGP-2), glicoproteína epitelial-40 (EGP-40), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), receptor tirosina-proteína quinasas erb-B2,3,4 (erb-B2,3,4), proteína de unión a folato (FBP), receptor de acetilcolina fetal (AChR), receptor de folato- a, gangliósido G2 (GD2),
- 30 gangliósido G3 (GD3), guanilil ciclasa C (GCC), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (ITER-2), transcriptasa inversa de telomera humana humana (hTERT), subunidad alfa del receptor de interleucina-13 2 (IL- 13Rcx2), cadena ligera k, receptor de

dominio de inserción de quinasa (KDR), Lewis Y (LeY), molécula de adhesión celular LI (L1CAM), familia de antígenos de melanoma A, 1 (MAGE-A1), mucina 16 (MUC16), mucina 1 (MUC1), mesotelina (MSLN), E RBB2, MAGEA3, p53, MARTI, GPI00, proteinasa3 (PR1), tirosinasa, survivina, hTERT, EphA2, ligandos NKG2D, antígeno de cáncer testicular NY-ES0-1, antígeno oncofetal (h5T4), antígeno de células madre prostáticas (PSCA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), PTK7 ROR1, glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72), factor de crecimiento endotelial vascular R2 (VEGF-R2) y proteína del tumor de Wilms (WT-1), BCMA, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, CD99, CD70, ADGRE2, CCR1, LILRB2, PRAME CCR4, CD5, CD3, TRBC1, TRBC2, TIM-3, Integrin B7, ICAM-I, CD70, Tim3, CLEC12A y ERBB.

[0239] En determinadas modalidades, el CAR se une a un polipéptido CD19. En determinadas modalidades, el CAR se une a un polipéptido CD19 humano. En determinadas modalidades, el CAR se une al dominio extracelular de una proteína CD19. En determinadas modalidades, el CAR de CD19 comprende una secuencia proporcionada en la Tabla 3.

[0240] En determinadas modalidades, el CAR se une a un polipéptido GCC. En determinadas modalidades, el CAR se une a un polipéptido GCC humano. En determinadas modalidades, el CAR se une al dominio extracelular de una proteína GCC. En determinadas modalidades, el CAR anti-GCC comprende una secuencia proporcionada en la Tabla 3.

[0241] En determinadas modalidades, el CAR se une a un polipéptido de mesotelina. En determinadas modalidades, el CAR se une a un polipéptido de mesotelina humana. En determinadas modalidades, el CAR se une al dominio extracelular de una proteína de mesotelina.

[0242] En determinadas modalidades, el CAR se une a un antígeno patógeno, por ejemplo, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección patógena u otra enfermedad infecciosa, por ejemplo, en un sujeto inmunocomprometido. Los ejemplos no limitantes de patógenos incluyen virus, bacterias, hongos, parásitos y protozoos capaces de causar enfermedades.

[0243] Los ejemplos no limitantes de virus incluyen, Retroviridae (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, como el VIH-I (también denominado HDTV-III, LAVE o HTLV-IIELAV, o VIH-III; y otros aislados, como el VIH-LP; Picornaviridae (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humano, rinovirus, echovirus); Calciviridae (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus

de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus del ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la influenza virus); Bungaviridae (por ejemplo, virus Hantaan, virus bunga, phlebovirus y virus Nairo); Arenaviridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del poliovirus); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes; Poxviridae (virus de la viruela, virus vaccinia, poxvirus) e Iridoviridae (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1 = transmisión interna; clase 2 = transmisión parenteral (es decir, hepatitis C); Norwalk y virus relacionados y astrovirus).

[0244] Los ejemplos no limitantes de bacterias incluyen *Pasteurella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* spp. (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especie anaerobia), *Streptococcus pneumoniae*, patógeno *Campylobacter* ., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

[0245] En determinadas modalidades, el antígeno patógeno es un antígeno viral presente en el citomegalovirus (CMV), un antígeno viral presente en el virus de Epstein Barr (EBV),

un antígeno viral presente en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o un antígeno viral presente en el virus de la influenza.

[0246] En determinadas modalidades, el dominio extracelular del CAR comprende un enlazador. En algunas modalidades, el enlazador comprende GGGGS (SEQ ID NO: 59). En algunas modalidades, el enlazador comprende (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 59), donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas modalidades, el enlazador comprende GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 61).

[0247] En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno extracelular comprende un anticuerpo de IgA, anticuerpo de IgG, anticuerpo de IgE, anticuerpo de IgM, anticuerpo bi o multiespecífico, fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')₂, fragmento Fd', fragmento Fd, CDR aisladas o conjuntos de estas; fragmento variable monocatenario (scFv), fusión polipéptido-Fc, anticuerpo de un solo dominio (sdAb), anticuerpo de camélidos; anticuerpo enmascarado, productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños ("SMIPsTM"), monocatenario, diacuerpo en tándem, VHH, anticalina, nanocuerpo, humacuerpo, minicuerpos, BiTE, proteína de repetición de anquirina, DARPIN, Avimer, DART, anticuerpo tipo TCR, adnectina, afilina, transcuerpo; Affibody, TrimerX, MicroProtein, finómero, centirina; y KALBITOR o sus fragmentos.

[0248] En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR comprende un fragmento variable monocatenario (scFv). En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR comprende un anticuerpo de dominio único (sdAb). En algunas modalidades, el anticuerpo de un solo dominio (sdAb),

Dominio transmembrana

[0249] Como se describe en la presente descripción, el CAR comprende un dominio transmembrana. Con respecto al dominio transmembrana, el CAR comprende uno o más dominios transmembranas fusionados con el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR. El dominio transmembrana puede derivar de una fuente natural o de una fuente sintética. Donde la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana.

[0250] Las regiones transmembrana de uso particular en los CAR descritos en la presente descripción pueden derivarse de (es decir, comprender al menos la(s) región(es) transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, mesotelina, CD33, CD37, CD64, CD80,

CD86, CD134, CD137, CD154. Alternativamente, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá predominantemente residuos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunas modalidades, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembranario sintético. Opcionalmente, un

5 enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembranario y el dominio de señalización citoplasmático del CAR. En algunas modalidades, el enlazador es un doblete de glicina-serina o un enlazador de alanina triple.

[0251] En algunas modalidades, el dominio transmembrana que naturalmente se asocia a

10 uno de los dominios en el CAR se usa además de los dominios transmembrana descritos anteriormente. En algunas modalidades, el dominio transmembrana puede seleccionarse mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas proteínas de membrana superficial o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

15 **[0252]** En algunas modalidades, el dominio transmembrana en el CAR de la invención es un dominio transmembrana CD28. En algunas modalidades, el dominio transmembrana CD28 comprende la secuencia de ácido nucleico de FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV SEQ ID NO: 42. En algunas modalidades, el dominio transmembrana CD28 comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:

20 42. En algunas modalidades, el dominio transmembrana comprende una secuencia que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 o una secuencia con al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42.

25 **[0253]** En el CAR, un dominio espaciador, también denominado dominio de bisagra, puede disponerse entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana, o entre el dominio intracelular y el dominio transmembrana. El dominio espaciador significa cualquier oligopéptido o polipéptido que sirve para enlazar el dominio transmembrana con el dominio extracelular y/o el dominio transmembrana con el dominio intracelular. El dominio separador

30 comprende hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos, y con la máxima preferencia de 25 a 50 aminoácidos.

[0254] En varias modalidades, el enlazador puede incluir un elemento separador, que,

cuando está presente descripción, aumenta el tamaño del enlazador de manera que aumenta la distancia entre la molécula efectora o el marcador detectable y el fragmento de unión al anticuerpo o antígeno. Los separadores ilustrativos son conocidos por la persona experta en la técnica, e incluyen los enumerados en las Patentes de Estados Unidos núms. 7,964,566 7,498,298, 6,884,869, 6,323,315, 6,239,104, 6,034,065, 5,780,588, 5,665,860, 5,663,149, 5,635,483, 5,599,902, 5,554,725, 5,530,097, 5,521,284, 5,504,191, 5,410,024, 5,138,036, 5,076,973, 4,986,988, 4,978,744, 4,879,278, 4,816,444 y 4,486,414, así como también las publicaciones de Patentes de Estados Unidos núms. 20110212088 y 20110070248, cada una de las cuales se incorpora como referencia en la presente descripción en su totalidad.

[0255] El dominio separador tiene preferentemente una secuencia que promueve la unión de un CAR con un antígeno y mejora la señalización en una célula. Los ejemplos de un aminoácido que se espera que promueva la unión incluyen cisteína, un aminoácido cargado, y serina y treonina en un posible sitio de glicosilación, y estos aminoácidos pueden usarse como un aminoácido que constituye el dominio separador.

[0256] En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio bisagra. En algunas modalidades, el dominio bisagra comprende la secuencia de ácido nucleico de IEVMYPPPYLDNEKSNGTGTHVKKHLCPSPFLPGPSKP (SEQ ID NO: 41). En algunas modalidades, el dominio bisagra comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En algunas modalidades, el dominio bisagra comprende una secuencia que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41.

[0257] En algunas modalidades, los dominios bisagra y transmembrana se derivan de la misma molécula. En otras modalidades, los dominios bisagra y transmembrana se derivan de moléculas diferentes (por ejemplo, CD8 unido a CD28). En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio bisagra. En algunas modalidades, el dominio bisagra comprende la secuencia de ácido nucleico de IEVMYPPPYLDNEKSNGTTHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLVVVGVLACYSLLVTVAFI IFWV (SEQ ID NO: 43). En algunas modalidades, el dominio bisagra comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:

43. En algunas modalidades, el dominio bisagra comprende una secuencia que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43.

5 *Dominio intracelular*

[0258] El dominio citoplasmático o el dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha colocado el CAR. La expresión “función efectora” se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o actividad auxiliar que incluya la secreción de citocinas. Por lo tanto, la expresión “dominio de señalización intracelular” se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de función efectora y dirige la célula a la realización de una función especializada. Aunque generalmente puede emplearse todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar toda la cadena. En la medida en que se usa una porción truncada del dominio de señalización intracelular, esa porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de función efectora. El término dominio de señalización intracelular por lo tanto pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora.

[0259] Los ejemplos de dominios de señalización intracelulares para usar en el CAR incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de linfocitos T (TCR) y correceptores que actúan en conjunto para iniciar la transducción de señales después de la unión al receptor de antígenos, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional. Las señales generadas a través del TCR en solitario son insuficientes para la activación completa del linfocito T y también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, puede decirse que la activación de linfocitos T está mediada por dos clases distintas de secuencia de señalización citoplasmática: aquellas que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primarias) y aquellas que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmática secundarias).

[0260] Las secuencias de señalización citoplasmática primaria regulan la activación primaria

del complejo de TCR ya sea de manera estimulante o inhibitoria. Las secuencias de señalización citoplasmática primarias que actúan de manera estimulante pueden contener motivos de señalización conocidos como motivos de activación basados en tirosina del inmunorreceptor o ITAM. Los ejemplos de secuencias de señalización citoplasmática primaria que contienen ITAM que son de uso particular en los CAR descritos en la presente descripción incluyen los derivados de TCR zeta (CD3 Zeta), FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Ejemplos no limitantes específicos, del ITAM incluyen péptidos que tienen secuencias de números de aminoácidos 51 a 164 de CD3 zeta. (NCBI RefSeq: NP.sub.--932170.1), números de aminoácidos 45 a 86 de Fc.épsilon.RI.gamma. (NCBI RefSeq: NP.sub.--004097.1), números de aminoácidos 201 a 244 de Fc.épsilon.RI.beta. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000130.1), números de aminoácidos 139 a 182 de CD3.gamma. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000064.1), números de aminoácidos 128 a 171 de CD3.delta. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000723.1), números de aminoácidos 153 a 207 de CD3.épsilon. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000724.1), números de aminoácidos de 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2), números de aminoácidos de 707 a 847 de 0022 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001762.2), números de aminoácidos de 166 a 226 de CD79a (NCBI RefSeq: NP.sub.--001774.1), números de aminoácidos de 182 a 229 de CD79b (NCBI RefSeq: NP.sub.--000617.1) y números de aminoácidos de 177 a 252 de CD66d (NCBI RefSeq: NP.sub.--001806.2) y sus variantes que tienen la misma función que tienen estos péptidos. El número de aminoácido basado en la información de secuencia de aminoácidos de la ID de RefSeq del NCBI o GenBank descrita en la presente descripción se numera en función de la longitud completa del precursor (que comprende una secuencia de péptido señal, etc.) de cada proteína. En una modalidad, la molécula de señalización citoplasmática en el CAR comprende una secuencia de señalización citoplasmática derivada de CD3 zeta.

[0261] En algunas modalidades, el dominio intracelular del CAR puede diseñarse para comprender el dominio de señalización de CD3 zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio citoplasmático deseado útil en el contexto del CAR. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR puede comprender una porción de cadena CD3 zeta y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de la superficie celular que

no es un receptor de antígeno o sus ligandos, que es necesaria para una respuesta eficiente de los linfocitos a un antígeno. Los ejemplos de tales moléculas coestimuladoras incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares. Ejemplos específicos no limitantes, de tales moléculas coestimuladoras incluyen péptidos que tienen secuencias de números de aminoácidos 236 a 351 de CD2 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001758.2), números de aminoácidos 421 a 458 de CD4 (NCBI RefSeq: NP.sub.--000607.1), números de aminoácidos 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2), números de aminoácidos 207 a 235 de CD8.alfa. (NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3), números de aminoácidos 196 a 210 de CD83 (GenBank: AAA35664.1), números de aminoácidos 181 a 220 de CD28 (NCBI RefSeq: NP.sub.--006130.1), números de aminoácidos 214 a 255 de CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP.sub.--001552.2), números de aminoácidos 241 a 277 de CD134 (OX40, NCBI RefSeq: NP.sub.--003318.1) y números de aminoácidos 166 a 199 de ICOS (NCBI RefSeq: NP.sub.--036224.1) y sus variantes que tienen la misma función que tienen estos péptidos. Por lo tanto, aunque la descripción en la presente descripción se ejemplifica principalmente con 4-1BB como el elemento de señalización coestimulador, otros elementos coestimuladores están dentro del alcance de la descripción.

[0262] Las secuencias de señalización citoplasmáticas dentro de la porción de señalización citoplasmática del CAR pueden enlazarse entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un enlazador de oligopéptido o polipéptido corto, preferentemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud puede formar el enlace. En algunas modalidades, el enlazador es un doblete de glicina-serina o un enlazador de alanina triple.

[0263] En algunas modalidades, el dominio intracelular está diseñado para comprender un dominio de señalización coestimulador CD28. En algunas modalidades, el dominio intracelular del CAR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 44).

[0264] En algunas modalidades, el dominio intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28.

[0265] En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende un CD3-zeta con uno o más motivos de activación basados en tirosina del inmunorreceptor modificado (ITAM). En

algunas modalidades, el dominio intracelular comprende un CD3-zeta con el primero de los tres motivos de activación basados en tirosina (ITAM) del inmunorreceptor sin modificar y el segundo y tercer ITAM alterados, denominados "1XX". En algunas modalidades, el dominio intracelular del CAR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ
ID NO: 45)

[0266] En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio de señalización intracelular que comprende un polipéptido CD3z modificado (por ejemplo, un polipéptido CD3z humano modificado) que comprende un ITAM1 nativo, un BRS1 nativo, un BRS2 nativo, un BRS3 nativo, una variante de ITAM2 que tiene dos pérdidas de mutaciones de función, y una variante de ITAM3 que tiene dos mutaciones de pérdida de función, y una región de señalización coestimuladora que comprende un polipéptido CD28 (por ejemplo, un polipéptido CD28 humano).

[0267] En otra modalidad, el dominio intracelular se diseña para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. Aún en otra modalidad, el dominio intracelular se diseña para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28 y 4-1BB.

[0268] En algunas modalidades, el dominio intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta.

[0269] En algunas modalidades, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos proporcionada en la Tabla 3.

Tabla 3. Receptores de Antígenos Quiméricos Ilustrativos

	Secuencia
CAR anti-CD19	MGTSLLCWMALCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYAFSSSWMNWVKQRPGKGLEWIGRIYPGDEDTNYSKGFKDKATLT ADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGGQTTLTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVS YMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTSYFLTINN MEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAP

		TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLWVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF AAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 49)
CAR CD19 ratón	de de	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGY AFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTA DKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQ NVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLT ITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKIEFMYPPPYLDNERS NGTIIHIKEKHLCHTQSSPKLFWALVVAGVLCYGLLVVALCVIWTN <u>SRRNRLLQSDYMNMTPRRPLTRKPYQPYAPA</u> <u>RDFAAYRPRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKR</u> ARDPEMGGKQQRRRNPNQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR (SEQ ID NO: 62)
CAR CD19 humano (con CD3- 1xx)	de	MALPVTALLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSS YWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSS STAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGT NVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITNV QSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRRGKGGHDGLFQGLS TATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 63)
CAR CCG V1-01	anti-	MGWSCIIILFVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASIS HYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKN

	QFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLTVSSIE VMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRR GKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 47)
CAR anti- CCG V51	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTTLTVSSIEVMYP PPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTA TKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 48)
CAR anti- CCG V5	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFT FSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSRAAAIE VMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 50)
CAR anti- CCG V36	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFT FSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTTLTVSSRAAAIE VMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM

	GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 51)
CAR anti- CCG V1	MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASI SHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPK NQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLV VVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMK GERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 52)
CAR anti- CCG V48	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFT FSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPD SVKGRFTVSRD NAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGT LTVTVSSRAAAI EVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 53)
CAR anti- CCG V8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGL EWWAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSVYLQMNSLRAEDTG VYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLV VVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 54)
CAR anti- CCG V9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGRGL EWWAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS

	RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLV VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 55)
CAR anti-CCG V30	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSWVRQAPGKGR EWWAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLV VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 56)
CAR anti-CCG V31	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGR EWWAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRADDTA VYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLV VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 57)

Características funcionales de los CAR

[0270] Dentro del alcance de la invención también se incluyen expresamente partes funcionales de los CAR descritos en la presente descripción. El término “porción funcional” cuando se usa en referencia a un CAR se refiere a cualquier parte o fragmento de uno o más de los CAR descritos en la presente descripción, cuya parte o fragmento retiene la actividad biológica del CAR del cual es una parte (el CAR parental). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un CAR que retienen la capacidad de

reconocer células diana, o detectar, tratar, o prevenir una enfermedad, en un grado similar, el mismo grado, o en un grado mayor, que el CAR parental. Con referencia al CAR parental, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 10 %, 25 %, 30 %, 50 %, 68 %, 80 %, 90 %, 95 %, o más, del CAR parental.

5 **[0271]** La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxi terminal de la porción, o en ambos extremos, cuyos aminoácidos adicionales no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del CAR parental. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, reconocer células diana, detectar cáncer, tratar o prevenir el
10 cáncer, etc. Más convenientemente, los aminoácidos adicionales mejoran la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del CAR parental.

[0272] En el alcance de la descripción se incluyen variantes funcionales de los CAR descritos en la presente descripción. El término “variante funcional” como se usa en la presente descripción se refiere a un CAR, polipéptido, o proteína que tiene identidad de
15 secuencia sustancial o significativa o similar a un CAR parental, cuya variante funcional retiene la actividad biológica del CAR del cual es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del CAR descrito en la presente descripción (el CAR parental) que retienen la capacidad de reconocer células diana en un grado similar, el mismo grado, o en un grado mayor, que el CAR parental. Con referencia al CAR parental,
20 la variante funcional puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 30 %, 50 %, 75 %, 80 %, 90 %, 98 % o más idéntica en secuencia de aminoácidos al CAR parental.

[0273] Una variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del CAR parental con al menos una sustitución de aminoácidos conservadora. Alternativa o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender, por ejemplo, la secuencia de
25 aminoácidos del CAR parental con al menos una sustitución de aminoácidos no conservadora. En este caso, es preferente que la sustitución de aminoácidos no conservadora no interfiera ni inhiba la actividad biológica de la variante funcional. La sustitución de aminoácidos no conservadora puede mejorar la actividad biológica de la variante funcional, de manera que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en
30 comparación con el CAR parental.

[0274] Las sustituciones de aminoácidos de los CAR son preferentemente sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se conocen

en la técnica, e incluyen sustituciones de aminoácidos en las que un aminoácido que tiene ciertas propiedades físicas y/o químicas se intercambia por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades químicas o físicas o similares. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos conservadora puede ser un aminoácido polar con carga ácida/negativa sustituido por otro aminoácido polar con carga ácida/negativa (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, He, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val., etc.), un aminoácido polar básico/positivo sustituido por otro aminoácido polar básico/positivo (por ejemplo, Lys, His, Arg, etc.), un aminoácido sin carga con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido sin carga con una cadena lateral polar (por ejemplo, Asn, Gin, Ser, Thr, Tyr, etc.), un aminoácido con una cadena lateral ramificada beta sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral ramificada beta (por ejemplo, He, Thr y Val), un aminoácido con una cadena lateral aromática sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral aromática (por ejemplo, His, Phe, Trp y Tyr), etc.

[0275] El CAR puede consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en la presente descripción, de manera que otros componentes, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambian materialmente la actividad biológica de la variante funcional.

[0276] Los CAR (que incluyen las porciones funcionales y variantes funcionales) pueden ser de cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier cantidad de aminoácidos, siempre que los CAR (o porciones funcionales o variantes funcionales de estos) retengan su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente al antígeno, detectar células enfermas en un mamífero, o tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero, etc. Por ejemplo, el CAR puede ser de aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 aminoácidos de largo, tales como 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos de longitud.

[0277] Los CAR (que incluyen porciones funcionales y variantes funcionales de la invención) pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos naturales. Tales aminoácidos sintéticos se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ácido carboxílico aminociclohexano, norleucina, -ácido amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina β -

hidroxifenilalanina, fenilglicina, a-naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolina-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, omitina, ácido carboxílico -aminociclopentano, ácido 5 carboxílico a-aminociclohexano, ácido carboxílico a-aminocicloheptano, ácido a-(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido γ -diaminobutírico, ácido β -diaminopropiónico, homofenilalanina, y a-terc-butilglicina.

[0278] Los CAR (que incluyen porciones funcionales y variantes funcionales) pueden ser glicosilados, amidados, carboxilados, fosforilados, esterificados, N-acilados, ciclados a 10 través de, por ejemplo, un puente disulfuro, o convertidos en una sal de adición ácida y/o opcionalmente dimerizados o polimerizados, o conjugados.

Sustituciones y Variantes

[0279] En algunas modalidades, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en la presente descripción. Por ejemplo, puede ser deseable 15 mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones adecuadas en la secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Esas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del 20 anticuerpo. Puede hacerse cualquier combinación de eliminaciones, inserciones y sustituciones para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión al antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y eliminación

[0280] En algunas modalidades, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una 25 o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las HVR y FR. Como se describirá más abajo en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés y los productos evaluados en busca de una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígenos retenidos/mejorados, inmunogenia disminuida, o 30 ADCC o CDC mejorada.

[0281] Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con propiedades comunes de cadenas laterales:

[0282] (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0283] (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0284] (3) ácidos: Asp, Glu;

[0285] (4) básicos: His, Lys, Arg;

5 **[0286]** (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

[0287] (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[0288] Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

10 **[0289]** Un tipo de variante institucional implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Por lo general, la o las variantes resultantes seleccionadas para un estudio adicional tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, una mayor afinidad, una inmunogenia reducida) con relación al anticuerpo original y/o mantendrán sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo parental.

15 Una variante institucional ilustrativa es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse convenientemente, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de maduración por afinidad con expresión en fagos tales como las descritas en la presente descripción. Brevemente, uno o más residuos de HVR se mutan y los anticuerpos variantes se muestran en fagos y se evalúan en busca de una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad
20 de unión).

[0290] Las alteraciones (por ejemplo, sustituciones) pueden hacerse en HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de anticuerpos. Tales alteraciones pueden hacerse en “puntos calientes” de HVR, es decir, residuos codificados por codones que experimentan una mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (ver, por ejemplo,
25 Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), con la variante VH o VL resultante que se está evaluando para determinar la afinidad de unión. Se ha descrito la maduración de afinidad mediante la construcción y reselección de bibliotecas secundarias, por ejemplo, en Hoogenboom y otros, en *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O’ Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas modalidades de
30 maduración por afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para la maduración mediante cualquiera de una variedad de métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, intercambio de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Luego se

crea un banco secundario. Luego, el banco se evalúa para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir la diversidad implica estrategias dirigidas a HVR, en las que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Los residuos de HVR involucrados en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, mediante el uso de modelado o mutagénesis con barrido de alanina. La CDR-H3 y la CDR-L3 en particular a menudo son dianas.

[0291] En algunas modalidades, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones pueden ocurrir dentro de una o más HVR siempre que esas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, las alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporcionan en la presente) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión pueden realizarse en HVR. Esas alteraciones pueden estar fuera de los “puntos calientes” de HVR o CDR. En algunas modalidades de las variantes de secuencias VHH proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada, o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

[0292] Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que pueden seleccionarse como objetivos para la mutagénesis se denomina “mutogénesis con barrido de alanina” como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. En este método, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se identifican y remplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácidos que muestran una sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativa o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Esos residuos de contacto y residuos vecinos pueden dirigirse o eliminarse como candidatos para la sustitución. Las variantes pueden tamizarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.

[0293] Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremo amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cientos o más residuos, así como inserciones dentro de una secuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un

anticuerpo con un residuo metionilo de extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N-terminal o C-terminal del anticuerpo en una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida sérica del anticuerpo.

5 b) Variantes de glucosilación

[0294] En algunas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente se altera para aumentar o disminuir la medida en que el anticuerpo se glicosila. La adición o eliminación de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede lograrse convenientemente al alterar la secuencia de aminoácidos de manera que se crean o eliminan uno o más sitios de glicosilación.

[0295] Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a este puede alterarse. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamíferos normalmente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado al que generalmente se une un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright y otros. TIBTECH 15: 26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, p. ej., manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el “tallo” de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas modalidades, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la presente solicitud pueden hacerse para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

[0296] En algunas modalidades, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidratos que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con relación a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alta manosa) según lo medido por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 hace referencia al residuo de asparagina localizado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración EU de residuos de la región Fc); sin embargo, el Asn297 también puede localizarse alrededor de ± 3 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en anticuerpos. Esas variantes de fucosilación pueden tener una función

de ADCC mejorada. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patentes de Estados Unidos núms. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos “desfucosiladas” o “con deficiencia de fucosa” incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et ál. J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et ál. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 con deficiencia en la fucosilación de proteínas (Ripka y otros. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); la solicitud de patente de Estados Unidos núm. US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams y otros), y líneas celulares inactivadas, tales como alfa-1, gen 6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO inactivadas (ver, por ejemplo, Yamane-Ohnuki y otros. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. y otros, Biotechnol. Bioeng., 94(4): 680-688 (2006); y WO2003/085107).

[0297] A las variantes de anticuerpos se les proporcionan además oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en los cuales un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo es bisecado por GlcNAc. Esas variantes de anticuerpos pueden tener una fucosilación reducida y/o una función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de esas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet y otros); patente de Estados Unidos núm. 6,602,684 (Umana y otros); y US 2005/0123546 (Umana y otros). También se proporcionarán variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Esas variantes de anticuerpos pueden tener una función CDC mejorada. Esas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel y otros); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

[0298] Los CAR (que incluyen partes funcionales y variantes funcionales de estas) pueden obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica. Los CAR pueden fabricarse mediante cualquier método adecuado para fabricar polipéptidos o proteínas. Los métodos adecuados de polipéptidos y proteínas sintetizantes *de novo* se describen en referencias, tales como Chan et ál., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino

Unido, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et ál., Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2001; y la patente de Estados Unidos n.º 5,449,752. Además, los polipéptidos y las proteínas pueden producirse de manera recombinante mediante el uso de los ácidos nucleicos descritos en la presente mediante el uso de métodos recombinantes convencionales. Véase, por ejemplo, Sambrook et ál., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel et ál., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. Además, algunos de los CAR (que incluyen partes funcionales y variantes funcionales de estas) pueden aislarse y/o purificarse a partir de una fuente, tal como una planta, una bacteria, un insecto, un mamífero, p. ej., una rata, un ser humano, etc. Los métodos de aislamiento y purificación se conocen bien en la técnica. Alternativamente, los CAR descritos en la presente (incluidas las partes funcionales y variantes funcionales de estas) pueden ser sintetizados comercialmente por empresas. En este sentido, los CAR pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados.

Marcadores y etiquetas detectables

[0299] Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión a antígenos de estos, específicos para uno o más de los antígenos descritos en la presente descripción, también puede expresarse con (por ejemplo, expresarse conjuntamente) una proteína etiqueta. En algunas modalidades, un sitio de reconocimiento de furina y una secuencia de péptidos de ribosoma 2A aguas abajo, diseñada para la expresión bicistónica simultánea de la secuencia etiqueta y la secuencia del CAR. En algunas modalidades, la secuencia 2A comprende la secuencia de ácido nucleico de GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP, la SEQ ID NO: 58. En algunas modalidades, la secuencia de furina y P2A comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58. En algunas modalidades, la etiqueta de P2A comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, o una secuencia con al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % de identidad de esta.

[0300] Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión al antígeno de estos, específicos para uno o más de los antígenos descritos en la presente descripción, también pueden conjugarse con un marcador detectable; por ejemplo,

un marcador detectable capaz de detectarse mediante ELISA, espectrofotometría, citometría de flujo, microscopía o técnicas de diagnóstico por imágenes (como la tomografía computarizada (CT), exploraciones por tomografía axial computarizada (TAC), resonancia magnética (MRI), resonancia magnética nuclear NMRI), tomografía de resonancia magnética (MTR), ultrasonido, examen de fibra óptica, y laparoscópica). Los ejemplos no limitantes específicos de marcadores detectables incluyen fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enlaces enzimáticos, isótopos radioactivos y metales pesados o compuestos (por ejemplo, nanocristales de óxido de hierro superparamagnético para la detección por RM). Por ejemplo, los marcadores detectables útiles incluyen compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfónico, fitoeritrina, fósforos de lantanida y similares. También se usan marcadores bioluminiscentes, tales como luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP). Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno de este, también puede conjugarse con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno de este, se conjuga con una enzima detectable, puede detectarse mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que puede discernirse. Por ejemplo, cuando el agente peroxidasa de rábano picante está presente descripción, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es visualmente detectable. Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno de este, también puede conjugarse con biotina, y detectarse a través de la medición indirecta de la unión a avidina o estreptavidina. Cabe destacar que la avidina en sí puede conjugarse con una enzima o una etiqueta fluorescente.

[0301] Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de este, puede conjugarse con un agente paramagnético, tal como gadolinio. Los agentes paramagnéticos como el óxido de hierro superparamagnético también se usan como etiquetas. Los anticuerpos también pueden conjugarse con lantánidos (tales como el europio y el disprosio) y manganeso. Un fragmento de unión a anticuerpos o antígenos también puede etiquetarse con epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (tal como secuencias de par de cierre de leucina, sitios de unión

para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomos).

[0302] Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno de este, también puede conjugarse con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede usarse para fines diagnósticos y terapéuticos. Por ejemplo, la radioetiqueta puede usarse para detectar uno o más de los antígenos descritos en la presente y células que expresan antígenos mediante rayos X, espectros de emisión, u otras técnicas de diagnóstico. Además, el radiomarcador puede usarse terapéuticamente como una toxina para el tratamiento de tumores en un sujeto, por ejemplo, para el tratamiento de un neuroblastoma. Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

[0303] Los medios de detección de esos marcadores detectables son conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, por ejemplo, las radioetiquetas pueden detectarse mediante el uso de contadores de película fotográfica o centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse mediante el uso de un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan normalmente al proporcionar un sustrato a la enzima y detectar el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las etiquetas colorimétricas se detectan simplemente al visualizar la etiqueta coloreada.

Células inmunoresponsivas y células hospederas

[0304] Un aspecto de la presente solicitud proporciona una célula efectora inmunitaria manipulada por ingeniería genética (por ejemplo, una célula inmunosensible). Tal como se usa en la presente descripción, "una célula inmunosensible" se refiere a una célula que funciona en una respuesta inmunológica o un progenitor, o descendencia del mismo. En algunas modalidades, la célula inmunosensible comprende el sistema inmunomodulador descrito en la presente descripción (por ejemplo, una célula que comprende un agente de direccionamiento con especificidad para un antígeno asociado a un tumor o un ligando de estrés; y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que modula la señalización del TGF- β). En algunas modalidades, la célula inmunosensible comprende el sistema inmunomodulador descrito en la presente descripción (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que modula la señalización del TGF- β).

[0305] En algunas modalidades, la célula inmunitaria efectora es un linfocito T, una célula

NK, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente o una célula madre embrionaria. En algunas modalidades, la célula inmunosensible es un linfocito T.

[0306] Para los fines en la presente descripción, el linfocito T puede ser cualquier linfocito

5 T, tal como un linfocito T cultivado, por ejemplo, un linfocito T primario, o un linfocito T de una línea de linfocito T cultivada, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o un linfocito T obtenido de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, el linfocito T puede obtenerse de numerosas fuentes, que incluyen pero no se limitan a sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, el timo, u otros tejidos o líquidos. Los linfocitos T también pueden enriquecerse o purificarse. El
10 linfocito T puede ser un linfocito T humano. El linfocito T puede ser un linfocito T aislado de un ser humano. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede ser de cualquier etapa de desarrollo, que incluye, pero no se limita a, linfocitos T doblemente positivos para CD4+/CD8+, El linfocitos T cooperadores para CD4+, por ejemplo, linfocitos Th1 y Th2, linfocitos T para CD8+ (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos), células infiltrantes de tumor,
15 linfocitos T de memoria, células madre de memoria, es decir, Tscm, linfocitos T vírgenes y similares. El linfocito T puede ser un linfocito T CD8+ o un linfocito T CD4+.

[0307] En una modalidad, los CAR como se describen en la presente descripción pueden usarse en células no T adecuadas. Tales células son aquellas con una función inmunitaria efectora, tal como, por ejemplo, células NK, y células similares a T generadas a partir de
20 células madre pluripotentes.

[0308] Una modalidad proporciona además una célula hospedera que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, la expresión “célula hospedera” se refiere a cualquier tipo de célula que puede contener el vector de expresión recombinante de la
25 invención. La célula hospedera puede ser una célula eucariota, por ejemplo, de planta, animal, hongos o algas, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacterias o protozoos. La célula hospedera puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula hospedera puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula
30 que crezca en suspensión. Las células hospedera adecuadas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, células de E. coli DH5 α , células de ovarios de hámsteres chinos, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares. Con el fin de amplificar

o replicar el vector de expresión recombinante, la célula hospedera puede ser una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5a. Con el fin de producir un CAR recombinante, la célula hospedera puede ser una célula de mamífero. La célula hospedera puede ser una célula humana. Aunque la célula hospedera puede ser de cualquier tipo de célula, puede originarse de cualquier tipo de tejido, y puede ser de cualquier etapa de desarrollo, la célula hospedera puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). La célula hospedera puede ser un linfocito T.

[0309] También se proporciona en una modalidad una población de células que comprende al menos una célula hospedera descrita en la presente descripción. La población de células puede ser una población heterogénea que comprenda la célula hospedera que comprenda cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo, una célula hospedera (por ejemplo, un linfocito T), que no comprenda ninguno de los vectores de expresión recombinante, o una célula que no sea un linfocito T, por ejemplo, un linfocito B, un macrófago, un neutrófilo, un linfocito, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Alternativamente, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprenda principalmente células hospederas (por ejemplo, que consistan esencialmente en) que comprendan el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la que todas las células de la población sean clones de una sola célula hospedera que comprenda un vector de expresión recombinante, de manera tal que todas las células de la población comprendan el vector de expresión recombinante. En una modalidad de la invención, la población de células es una población clonal que comprende células hospederas que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe en la presente descripción.

[0310] Los CAR (que incluyen porciones funcionales y variantes de estas), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedero (que incluyen poblaciones de estas), y anticuerpos (que incluyen porciones de unión al antígeno de estas), pueden aislarse y/o purificarse. Por ejemplo, una preparación de célula hospedera purificada (o aislada) es una en la que la célula hospedera es más pura que las células en su entorno natural dentro del cuerpo. Tales células hospederas pueden producirse, por ejemplo, mediante técnicas de purificación estándar. En algunas modalidades, una preparación de

una célula hospedera se purifica de manera que la célula hospedera representa al menos aproximadamente 50 %, por ejemplo al menos aproximadamente 70 %, del contenido total de células de la preparación. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente 50 %, puede ser mayor que aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 %, o puede ser aproximadamente 100 %.

Ácidos nucleicos y vectores de expresión

[0311] Proporcionado además por una modalidad de la invención es un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los CAR, un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de este, descritos en la presente descripción (que incluye porciones funcionales y variantes funcionales de estas). Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las secuencias líderes, dominios de unión a antígenos, dominios transmembrana, y/o dominios de señalización de linfocitos T intracelulares descritos en la presente descripción.

[0312] En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos puede someterse a modificaciones de codones. Sin limitarse a una teoría particular, se cree que la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos aumenta la eficiencia de traducción de las transcripciones de ARNm. La optimización de codones de la secuencia de nucleótidos puede implicar sustituir un codón natural por otro codón que codifique el mismo aminoácido, pero puede traducirse mediante ARNt disponible más fácilmente dentro de una célula, lo que aumenta la eficiencia de traducción. La optimización de la secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras de ARNm secundarias que interferirían con la traducción, por lo que aumentaría la eficiencia de la traducción.

[0313] En una modalidad de la invención, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos modificada por codones que codifica el dominio de unión a antígenos del CAR de la invención. En otra modalidad de la invención, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos modificada por codones que codifica cualquiera de los CAR descritos en la presente descripción (que incluye las porciones funcionales y variantes funcionales de estas).

[0314] Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, YAC, episomas derivados del EBV, y similares. Un vector conveniente es aquel que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción adecuados modificados de manera que cualquier secuencia VH o VL pueda insertarse y

expresarse fácilmente. En esos vectores, el corte y empalme generalmente ocurre entre el sitio donante de corte y empalme en la región J insertada y el sitio de aceptación de corte y empalme que precede a la región C humana, y también en las regiones de corte y empalme dentro de los exones CH humanos. Los vectores de expresión adecuados pueden contener una cantidad de componentes, por ejemplo, un origen de replicación, un gen marcador seleccionable, uno o más elementos de control de la expresión, tales como un elemento de control de la transcripción (por ejemplo, promotor, potenciador o terminador) y/o una o más señales de traducción, una secuencia de señal o secuencia líder, y similares. La poliadenilación y terminación de la transcripción se producen en sitios cromosómicos naturales corriente abajo de las regiones codificantes. El anticuerpo quimérico resultante puede unirse a cualquier promotor fuerte. Los ejemplos de vectores adecuados que pueden usarse incluyen aquellos que sean adecuados para los hospederos de mamíferos y en función de sistemas de replicación viral, tales como el virus de simio 40 (SV40), virus del sarcoma Rous (RSV), adenovirus 2, virus del papiloma bovino (BPV), mutante BK de papovavirus (BKV), o citomegalovirus (CMV) de ratón y humano, y virus de la leucemia murina (MMLV), promotores de Ig naturales, etc. Una variedad de vectores adecuados se conocen en la técnica, que incluyen vectores que se mantienen en una sola copia o múltiples copias, o que se integran en el cromosoma de la célula hospedera, por ejemplo, mediante LTR, o mediante cromosomas artificiales modificados con múltiples sitios de integración (Lindenbaum et ál. *Nucleic Acids Res.* 32: e172 (2004), Kennard y otros. *Biotech Bioeng.* en línea, 20 de mayo de 2009). En una sección posterior se enumerarán ejemplos adicionales de vectores adecuados.

[0315] Por lo tanto, la invención proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo quimérico humano, humanizado o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de los anteriores), cadena de anticuerpo (por ejemplo, cadena pesada, cadena ligera) o una parte de unión al antígeno de una cadena de anticuerpo que se une al TGF β o al TGF β R. En algunas modalidades, la presente invención proporciona uno o más vectores de expresión que comprenden un dominio extracelular de ácido nucleico del TGF β R.

[0316] La expresión en las células hospederas eucariotas es útil porque esas células son más propensas que las células procariotas al ensamblaje y la secreción de un anticuerpo

adecuadamente plegado e inmunológicamente activo. Sin embargo, cualquier anticuerpo producido que sea inactivo debido a un pliegue inadecuado puede ser renaturalizable de acuerdo con métodos conocidos (Kim y Baldwin, "Specific Intermediates in the Dolding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Dolding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, págs. 459-89 (1982)). Es posible que las células hospederas produzcan partes de anticuerpos intactos, tales como dímeros de cadena ligera o dímeros de cadena pesada, que también son homólogos de anticuerpos de acuerdo con la presente invención.

[0317] Se proporciona además un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 70 % o más, por ejemplo, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % idéntico a un ácido nucleico que codifica una construcción de CAR descrita en la presente descripción.

[0318] En una modalidad, los ácidos nucleicos pueden incorporarse en un vector de expresión recombinante. En este sentido, una modalidad proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos. A los efectos de la presente descripción, la expresión "vector de expresión recombinante" significa un oligonucleótido o una construcción de polinucleótido con modificaciones genéticas que permite la expresión de un ARNm, una proteína, un polipéptido o un péptido por parte de una célula hospedera, cuando la construcción comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, la proteína, el polipéptido o el péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para tener el ARNm, la proteína, el polipéptido o el péptido expresados dentro de la célula. Los vectores no se producen naturalmente en su totalidad.

[0319] Sin embargo, las partes de los vectores pueden ser naturales. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, lo cual incluye, pero no se limita a, ADN y ARN, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, sintetizados u obtenidos en parte de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces internucleotídicos naturales o no naturales, o ambos tipos de enlaces. Preferentemente, los nucleótidos o enlaces internucleotídicos de origen no natural o

alterados no dificultan la transcripción o replicación del vector.

[0320] En una modalidad, el vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede usarse para transformar o transfectar cualquier célula hospedera adecuada. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambas, tales como plásmidos y virus. El vector puede seleccionarse del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, Md.), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), la serie pET (Novagen, Madison, Wis.), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia), y la serie pEXC (Pilo., California).

[0321] También pueden usarse vectores de bacteriófagos, tales como λ , λ ZapII (Stratagene), EMBL4 y λ NMI 149. Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBIO1, pBI101.2, pBHO1.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión en animales incluyen pEUK-C1, pMAM, y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión recombinante puede ser un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral o un vector lentiviral. Un vector lentiviral es un vector derivado de al menos una parte de un genoma de lentivirus, que incluye especialmente un vector lentiviral autoinactivante tal como se proporciona en Milone y otros, Mol. Term. 17(8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores de lentivirus que pueden usarse en la clínica, incluyen, por ejemplo, y no a modo de limitación, la tecnología de administración génica LENTIVECTOR® de Oxford BioMedica plc, el sistema de vector LENTIMAX™ de Lentigen y similares. También hay disponibles tipos no clínicos de vectores lentivirales, y un experto en la técnica los conocería.

[0322] Una serie de técnicas de transfección se conocen generalmente en la técnica (ver, por ejemplo, Graham y otros, Virology, 52: 456-467 (1973); Sambrook y otros, supra; Davis y otros, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986); y Chu y otros, Gene, 13: 97 (1981).

[0323] Los métodos de transfección incluyen la coprecipitación de fosfato de calcio (ver, por ejemplo, Graham y otros, supra), microinyección directa en células cultivadas (ver, por ejemplo, Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980)), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y otros, BioTechniques, 6: 742-751 (1988)), transferencia génica mediada por liposomas (ver, por ejemplo, Mannino y otros, BioTechniques, 6: 682-690 (1988)), transducción mediada por lípidos (ver, por ejemplo, Feigner y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987)), y suministro de ácido nucleico mediante el uso de microprojectiles de alta

velocidad (ver, por ejemplo, Klein y otros, *Nature*, 327: 70-73 (1987)).

[0324] En una modalidad, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante convencionales descritas en, por ejemplo, Sambrook y otros, *supra*, y Ausubel y otros, *supra*. Las construcciones de vectores de expresión, que son circulares o lineales, pueden prepararse para contener un sistema de replicación funcional en una célula hospedera procariota o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivarse, por ejemplo, a partir de ColE1, plásmido de 2 μ , λ , SV40, virus del papiloma bovino, y similares.

[0325] El vector de expresión recombinante puede comprender secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y terminación de la transcripción y traducción, que sean específicas para el tipo de célula hospedera (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) donde se haya de introducir el vector, según corresponda, y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN. El vector de expresión recombinante puede comprender sitios de restricción para facilitar la clonación.

[0326] El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permitan la selección de células hospederas transformadas o transfectadas. Los genes marcadores incluyen la resistencia a biocidas, por ejemplo, la resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., la complementación en un hospedador auxotrófico para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión inventiva incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a la neomicina/G418, genes de resistencia a la higromicina, genes de resistencia al histidinol, genes de resistencia a la tetraciclina, y genes de resistencia a la ampicilina.

[0327] El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR (que incluye porciones funcionales y variantes funcionales de este), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria o que hibrida a la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR. La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos del tejido y específicos del desarrollo, está dentro de la técnica del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de la habilidad del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV, un promotor de EFl alfa o un promotor que se encuentre en la repetición de extremo largo

del virus de células madre murinas.

[0328] Los vectores de expresión recombinantes pueden diseñarse para la expresión transitoria, para la expresión estable, o para ambas. Además, los vectores de expresión recombinantes pueden fabricarse para la expresión constitutiva o para la expresión inducible.

[0329] Además, los vectores de expresión recombinantes pueden fabricarse para incluir un gen suicida. Como se usa en la presente descripción, la expresión “gen suicida” se refiere a un gen que provoca la muerte de la célula que expresa el gen suicida. El gen suicida puede ser un gen que confiera sensibilidad con respecto a un agente, por ejemplo, un fármaco, a una célula en la que se exprese el gen, y hace que la célula muera cuando la célula entra en contacto con el agente o se expone al agente. Los genes suicidas se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el gen del herpes simple (HSV), el gen de la timidina cinasa (TK), la citosina daminasa, la purina nucleósido fosforilasa y la nitrorreductasa.

Métodos de tratamiento

[0330] La presente invención se refiere a métodos de tratamiento que comprenden administrar una molécula de unión a antígenos anti-TGF β , anti-TGF β R o un dominio extracelular de un TGF β R a un sujeto. En algunas modalidades, los CAR y las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente descripción pueden usarse en métodos para tratar o evitar una enfermedad en un mamífero. En este sentido, una modalidad proporciona un método para tratar o evitar el cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospederas, la población de células, los anticuerpos y/o las porciones de unión al antígeno de estos, y/o las composiciones farmacéuticas en una cantidad efectiva para tratar o evitar el cáncer en el mamífero.

[0331] En algunas modalidades, el CAR se expresa en las células del donante y la molécula de unión al antígeno anti-TGF β , anti-TGF β R o el dominio extracelular de un TGF β R se secreta a partir de estas células. En algunas modalidades, los linfocitos T donantes para su uso en la terapia con linfocitos T se obtienen de un paciente (por ejemplo, para una terapia con linfocitos T autólogos). En otras modalidades, los linfocitos T donantes para su uso en

la terapia con linfocitos T se obtienen a partir de un sujeto que no es el paciente (por ejemplo, una terapia con linfocitos T alogénicos). Los linfocitos T CAR+ pueden administrarse en una cantidad efectiva terapéuticamente. Por ejemplo, una cantidad efectiva terapéuticamente de linfocitos T puede ser al menos aproximadamente 10^4 células, al menos aproximadamente 10^5 células, al menos aproximadamente 10^6 células, al menos aproximadamente 10^7 células, al menos aproximadamente 10^8 células, al menos aproximadamente 10^9 , o al menos aproximadamente 10^{10} .

[0332] En algunas modalidades, la cantidad efectiva terapéuticamente de linfocitos T es de aproximadamente 10^4 células, aproximadamente 10^5 células, aproximadamente 10^6 células, aproximadamente 10^7 células, o aproximadamente 10^8 células. En algunas modalidades, la cantidad efectiva terapéuticamente de linfocitos T CAR es de aproximadamente 2×10^6 células/kg, aproximadamente 3×10^6 células/kg, aproximadamente 4×10^6 células/kg, aproximadamente 5×10^6 células/kg, aproximadamente 6×10^6 células/kg, aproximadamente 7×10^6 células/kg, aproximadamente 8×10^6 células/kg, aproximadamente 9×10^6 células/kg, aproximadamente 1×10^7 células/kg, aproximadamente 2×10^7 células/kg, aproximadamente 3×10^7 células/kg, aproximadamente 4×10^7 células/kg, aproximadamente 5×10^7 células/kg, aproximadamente 6×10^7 células/kg, aproximadamente 7×10^7 células/kg, aproximadamente 8×10^7 células/kg, aproximadamente 9×10^7 células/kg. En algunas modalidades, la cantidad efectiva terapéuticamente de linfocitos T viables positivos para CAR está entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 2×10^6 linfocitos T viables positivos para CAR por kg de peso corporal hasta una dosis máxima de aproximadamente 1×10^8 linfocitos T viables positivos para CAR.

[0333] En algunas modalidades, la cantidad efectiva terapéuticamente de linfocitos T viables positivos para CAR está entre aproximadamente $0,25 \times 10^6$ y 2×10^6 . En algunas modalidades, la cantidad efectiva terapéuticamente de linfocitos T viables positivos para CAR es de aproximadamente $0,25 \times 10^6$, $0,3 \times 10^6$, $0,4 \times 10^6$, aproximadamente $0,5 \times 10^6$, aproximadamente $0,6 \times 10^6$, aproximadamente $0,7 \times 10^6$, aproximadamente $0,8 \times 10^6$, aproximadamente $0,9 \times 10^6$, aproximadamente $1,0 \times 10^6$, aproximadamente $1,1 \times 10^6$, aproximadamente $1,2 \times 10^6$, aproximadamente $1,3 \times 10^6$, aproximadamente $1,4 \times 10^6$, aproximadamente $1,5 \times 10^6$, aproximadamente $1,6 \times 10^6$, aproximadamente $1,7 \times 10^6$, aproximadamente $1,8 \times 10^6$, aproximadamente $1,9 \times 10^6$, aproximadamente $2,0 \times 10^6$

linfocitos T viables positivos para CAR.

[0334] En algunas modalidades, la cantidad efectiva terapéuticamente de linfocitos T viables positivos para CAR está entre aproximadamente $0,4 \times 10^8$ y aproximadamente 2×10^8 linfocitos T viables positivos para CAR. En algunas modalidades, la cantidad efectiva terapéuticamente de linfocitos T viables positivos para CAR es de aproximadamente $0,4 \times 10^8$, aproximadamente $0,5 \times 10^8$, aproximadamente $0,6 \times 10^8$, aproximadamente $0,7 \times 10^8$, aproximadamente $0,8 \times 10^8$, aproximadamente $0,9 \times 10^8$, aproximadamente $1,0 \times 10^8$, aproximadamente $1,1 \times 10^8$, aproximadamente $1,2 \times 10^8$, aproximadamente $1,3 \times 10^8$, aproximadamente $1,4 \times 10^8$, aproximadamente $1,5 \times 10^8$, aproximadamente $1,6 \times 10^8$, aproximadamente $1,7 \times 10^8$, aproximadamente $1,8 \times 10^8$, aproximadamente $1,9 \times 10^8$, o aproximadamente $2,0 \times 10^8$ linfocitos T viables positivos para CAR.

[0335] Una modalidad comprende además la linfoeliminación del mamífero antes de administrar los CAR descritos en la presente descripción. Los ejemplos de linfoeliminación incluyen, pero no se limitan a, la quimioterapia de linfoeliminación no mieloablativa, la quimioterapia de linfoeliminación mieloablativa, la irradiación corporal total, etcétera.

[0336] Para los propósitos de los métodos, donde se administran células hospederas o poblaciones de células, las células pueden ser células alogénicas o autólogas al mamífero. En algunas modalidades, las células son autólogas para el mamífero. En algunas modalidades, las células son alógenas para el mamífero. Como se usa en la presente descripción, alogénico significa cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se introduce el material. Se considera que dos o más personas son alogénicas entre sí cuando los genes en uno o más locus no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser lo suficientemente distinto genéticamente para interactuar antigénicamente. Tal como se usa en la presente descripción, “autólogo” significa cualquier material derivado de la misma persona a quien se le reintroducirá posteriormente.

[0337] El mamífero al que se hace referencia en la presente puede ser cualquier mamífero. Como se usa en la presente descripción, el término “mamífero” se refiere a cualquier mamífero, incluidos, pero no se limita a, mamíferos del orden Rodentia, tal como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden Logomorpha, tal como conejos. Los mamíferos pueden ser del orden Carnivora, que incluye felinos (gatos) y caninos (perros). Los mamíferos pueden ser del orden Artiodactyla, que incluye bovinos (vacas) y cerdos (puercos) o del

orden Persodactyla, que incluye equinos (caballos). Los mamíferos pueden ser del orden Primates, Ceboids o Simoids (monos) o del orden Anthropoids (humanos y simios). En algunas modalidades, el mamífero es un humano.

[0338] Con respecto a los métodos, el cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, incluido

5 cualquier cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de la vejiga), cáncer óseo, cáncer de cerebro (por ejemplo, meduloblastoma), cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal, o ano recto, cáncer de ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, de la vesícula biliar, o de la pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal, o el oído medio, 10 cáncer de la cavidad bucal, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, tumores líquidos, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por 15 ejemplo, carcinoma pulmonar no microcítico y adenocarcinoma pulmonar), linfoma, mesotelioma, mastocitoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no hodgkiniano, leucemia linfocítica crónica B, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer pancreático, peritoneal, de epiplón y cáncer mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de 20 riñón, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, sarcoma sinovial, cáncer gástrico, cáncer de los testículos, cáncer de tiroides, y cáncer de uréter.

[0339] En determinadas modalidades, el cáncer es un cáncer gastrointestinal. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer gástrico. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer 25 colorrectal. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de colon. En algunas modalidades, el cáncer tiene expresión anormal del TGF β o una señalización anormal del TGF β .

[0340] Los términos “tratar” y “prevenir”, así como las palabras derivadas de estos, tal como se usan en la presente descripción, no implican necesariamente un tratamiento o prevención completa o del 100 %. Más bien, existen diversos grados de tratamiento o prevención sobre 30 los cuales un experto en la técnica reconoce que tienen un beneficio o efecto terapéutico potencial. En este sentido, los métodos pueden proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero.

[0341] Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el método pueden incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, por ejemplo, cáncer, que se está tratando o previniendo. Además, para los propósitos de la presente descripción, “prevención” puede abarcar retrasar el inicio de la enfermedad, o un síntoma o afección de esta.

[0342] Los métodos de análisis de un CAR para determinar la capacidad de reconocer células diana y para la especificidad del antígeno se conocen en la técnica. Por ejemplo, Clay y otros, J. Immunol, 163: 507-513 (1999), muestra métodos para medir la liberación de citocinas (por ejemplo, interferón- γ , factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interleucina 2 (IL-2)). Además, la función de CAR puede evaluarse mediante la medición de la citotoxicidad celular, como se describió en Zhao y otros, J. Immunol, 174: 4415-4423 (2005).

[0343] Otra modalidad proporciona el uso de los CAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedero, poblaciones de células, anticuerpos, o porciones de unión a antígenos de estos, y/o composiciones farmacéuticas de la invención, para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo, por ejemplo, cáncer, en un mamífero. El cáncer puede ser cualquiera de los tipos de cánceres descritos en la presente descripción.

[0344] Cualquier método de administración puede usarse para los agentes terapéuticos descritos, incluida la administración local y sistémica. Por ejemplo, puede usarse la administración tópica, oral, intravascular tal como intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intradérmica, intratecal y subcutánea. El modo de administración particular y el régimen de dosificación serán seleccionados por el médico tratante, teniendo en cuenta los detalles del caso (por ejemplo, el sujeto, la enfermedad, el estado de la enfermedad involucrado y si el tratamiento es profiláctico). En los casos en los que se administra más de un agente o composición, pueden usarse una o más vías de administración; por ejemplo, un agente quimioterápico puede administrarse por vía oral y un fragmento o conjugado o composición de unión a anticuerpos o antígenos puede administrarse por vía intravenosa. Los métodos de administración incluyen la inyección para la cual el CAR, el linfocito T CAR, los conjugados, los anticuerpos, los fragmentos de unión al antígeno, o las composiciones se proporcionan en un portador aceptable farmacéuticamente no tóxico tal como agua, solución salina, solución de Ringer, solución

de dextrosa, albúmina sérica humana al 5 %, aceites fijados, oleato de etilo, o liposomas. En algunas modalidades, la administración local de los compuestos descritos puede usarse, por ejemplo, mediante la aplicación del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno a una región de tejido de la cual se ha extraído un tumor, o una región que se sospecha que es propensa al desarrollo del tumor. En algunas modalidades, la liberación intratumoral (o cercana al tumor) sostenida de la preparación farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de unión a antígenos puede ser beneficiosa. En otros ejemplos, el conjugado se aplica como colirio tópicamente en la córnea o intravítreamente en el ojo.

10 **[0345]** Los agentes terapéuticos descritos pueden formularse en forma de dosificación unitaria adecuada para la administración individual de dosificaciones precisas. Además, los agentes terapéuticos descritos pueden administrarse en una dosis única o en un programa de dosis múltiples. Un programa de dosis múltiples es aquel en el que un tratamiento primario puede realizarse con más de una dosis separada, por ejemplo, de 1-10 dosis, 15 seguidas de otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores, según sea necesario para mantener o reforzar la acción de las composiciones. El tratamiento puede incluir dosis diarias o dosis diarias múltiples de compuesto(s) durante un período de unos pocos días a meses, o incluso años. Por lo tanto, el régimen de dosificación también se determinará, al menos en parte, en función de las necesidades particulares del sujeto a 20 tratar y dependerá del criterio del médico a cargo de la administración.

[0346] Las dosificaciones típicas de los anticuerpos o conjugados pueden variar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg.

25 **[0347]** En ejemplos particulares, al sujeto se le administra una composición terapéutica que incluye uno o más de los conjugados, anticuerpos, composiciones, los CAR, linfocitos T CAR o agentes adicionales, en un programa de dosificación diario múltiple, tal como al menos dos días consecutivos, 10 días consecutivos, etcétera, por ejemplo, por un período de semanas, meses, o años. En un ejemplo, al sujeto se le administran los conjugados, anticuerpos, composiciones o agentes adicionales durante un período de al menos 30 días, 30 tal como al menos 2 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 24 meses, o al menos 36 meses.

[0348] En algunas modalidades, los métodos descritos incluyen proporcionar cirugía,

terapia de radiación, y/o quimioterápicas al sujeto en combinación con un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, conjugado, CAR o linfocito T que expresa un CAR (por ejemplo, secuencialmente, sustancialmente de manera concomitante, o de manera concomitante). Los métodos y las dosificaciones terapéuticas de tales agentes y tratamientos son conocidos por los expertos en la técnica, y pueden determinarse por un clínico experto. La preparación y los programas de dosificación del agente adicional pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determine empíricamente el profesional capacitado. Los programas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service, (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

[0349] En algunas modalidades, la terapia combinada puede incluir la administración de una cantidad efectiva terapéuticamente de un inhibidor de cáncer adicional a un sujeto. Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos adicionales que pueden usarse con la terapia combinada incluyen agentes de unión a microtúbulos, intercaladores o reticuladores de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores de enzimas, reguladores génicos, e inhibidores de la angiogénesis. Estos agentes (que se administran en una cantidad efectiva terapéuticamente) y tratamientos pueden usarse solos o en combinación. Por ejemplo, cualquier agente antineoplásico o antiangiogénico adecuado puede administrarse en combinación con CAR, linfocitos T CAR, anticuerpos, fragmento de unión al antígeno, o conjugados descritos en la presente descripción. Los métodos y las dosificaciones terapéuticas de tales agentes se conocen por los expertos en la técnica, y pueden determinarse por un médico experto.

[0350] Los agentes quimioterápicos adicionales incluyen, pero no se limitan a agentes alquilantes, como mostazas de nitrógeno (por ejemplo, clorambucilo, clormetina, ciclofosfamida, ifosfamida, y melfalán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, fotemustina, lomustina, y estreptozocina), compuestos de platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y BBR3464), busulfán, dacarbazina, mecloretamina, procarbazona, temozolomida, tiotepa, y uramustina; antimetabolitos, como el ácido fólico (por ejemplo, metotrexato, pemetrexed, y raltitrexed), purina (por ejemplo, cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, y tioguanina), pirimidina (por ejemplo, capecitabina), citarabina, fluorouracilo, y gemcitabina; alcaloides vegetales, como el podófilo (por ejemplo,

etopósido, y tenipósido), taxano (por ejemplo, docetaxel y paclitaxel), vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, y vinorelbina); antibióticos citotóxicos/antineoplásicos, como los miembros de la familia de las antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, y valrubicina), bleomicina, 5 rifampicina, hidroxiurea, y mitomicina; inhibidores de la topoisomerasa, tales como topotecán e irinotecán; anticuerpos monoclonales, como el alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, rituximab, panitumumab, pertuzumab, y trastuzumab; fotosensibilizadores, como el ácido aminolevulínico, aminolevulinato de metilo, porfímero de sodio, y verteporfina; y otros agentes, como la alitretinoína, altretamina, amsacrina, 10 anagrelida, trióxido de arsénico, asparaginasa, axitinib, bexaroteno, bevacizumab, bortezomib, celecoxib, denileucina diftotox, erlotinib, estramustina, gefitinib, hidroxycarbamida, imatinib, lapatinib, pazopanib, pentostatina, masoprocol, mitotano, pegaspargasa, tamoxifeno, sorafenib, sunitinib, vemurafinib, vandetanib, y tretinoína. Los expertos en la técnica conocen la selección y las dosificaciones terapéuticas de dichos 15 agentes, y pueden determinarse por un clínico experto.

[0351] La terapia combinada puede proporcionar sinergia y probar ser sinérgica, es decir, el efecto que se logra cuando los ingredientes activos usados juntos es mayor que la suma de los efectos como resultado del uso de los compuestos por separado. Puede lograrse un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos se: (1) formulan conjuntamente y se 20 administran o suministran de manera concomitante en una formulación de dosificación unitaria, combinada; (2) suministran alternativamente o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se suministran alternativamente, puede lograrse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o se suministran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En 25 general, durante la alternación, una dosificación efectiva de cada ingrediente activo se administra secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia combinada, las dosificaciones efectivas de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

[0352] En varias modalidades, el sistema de modulación inmunitario comprende un modulador de señalización del TGF β descrito en la presente descripción puede incluirse en 30 un curso de tratamiento que incluye además la administración de al menos un agente adicional a un sujeto. En varias modalidades, un agente adicional administrado en combinación con el sistema de modulación inmunitaria que comprende el modulador de

señalización del TGF β como se describe en la presente descripción puede ser un agente de quimioterapia. En varias modalidades, un agente adicional administrado en combinación con un agente aglutinante al antígeno como se describe en la presente descripción puede ser un agente que inhibe la inflamación.

5 **[0353]** En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF β es un anticuerpo de un solo dominio o un scFv secretable con especificidad para TGF β humano. En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF β es un anticuerpo de un solo dominio o un scFv secretable con especificidad por un TGF β R humano. En algunas modalidades, el anticuerpo de dominio único anti-GCC puede conjugarse (por ejemplo, unirse) a un agente
10 terapéutico (por ejemplo, un agente quimioterápico y un átomo radioactivo) para unirse a una célula cancerígena, suministrar un agente terapéutico a la célula cancerígena, y destruir la célula cancerígena que expresa la GCC humana. En algunas modalidades, el modulador de señalización del TGF β está vinculado a un agente terapéutico. En algunas modalidades, el agente terapéutico es un agente quimioterápico, una citocina, un átomo radioactivo, un
15 ARNsi, o una toxina. En algunas modalidades, el agente terapéutico es un agente quimioterápico. En algunas modalidades, el agente es un átomo radioactivo.

[0354] En algunas modalidades, los métodos pueden realizarse junto con otras terapias para trastornos con señalización anormal del TGF β . Por ejemplo, la composición puede administrarse a un sujeto al mismo tiempo, antes, o después de la quimioterapia. En algunas
20 modalidades, la composición puede administrarse a un sujeto al mismo tiempo, antes o después de un método de terapia adoptiva.

[0355] En diversas modalidades, un agente adicional administrado en combinación con el sistema inmunomodulador que comprende un modulador de señalización del TGF β como se describe en este documento, puede administrarse al mismo tiempo que el modulador de
25 señalización del TGF β , el mismo día o en la misma semana. En diversas modalidades, un agente adicional administrado en combinación con el modulador de señalización del TGF β como se describe en la presente descripción puede administrarse en una sola formulación con el sistema inmunomodulador. En ciertas modalidades, un agente adicional administrado de una manera separada temporalmente de la administración de un modulador de
30 señalización del TGF β como se describe en la presente descripción, por ejemplo, una o más horas antes o después, uno o más días antes o después, una o más semanas antes o después, o uno o más meses antes o después de la administración de el modulador de

señalización del TGF β . En varias modalidades, la frecuencia de administración de uno o más agentes adicionales puede ser la misma, similar, o diferente de la frecuencia de administración del modulador de señalización del TGF β como se describe en la presente descripción.

- 5 **[0356]** En algunas modalidades, las composiciones pueden formularse con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, terapias adicionales para tratar o evitar un trastorno asociado al TGF β (por ejemplo, un cáncer o trastorno autoinmunitario) en un sujeto. Los agentes adicionales para tratar un trastorno asociado al TGF β en un sujeto
 10 variarán en dependencia del trastorno particular que se trata, pero pueden incluir, sin limitación, rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, osfamida, carboplatino, etopósido, dexametasona, citarabina, cisplatino, ciclofosfamida o fludarabina.

Composiciones

- [0357]** Las composiciones se proporcionan en la presente descripción para su uso en terapia génica, inmunoterapia y/o terapia celular que incluyen uno o más de los CAR
 15 descritos, o linfocitos T que expresan un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión a antígenos, conjugados, los CAR, o linfocitos T que expresan un CAR que se unen específicamente a uno o más antígenos descritos en la presente descripción, en un portador (tal como un portador farmacéuticamente aceptable). Las composiciones pueden prepararse en formas de dosificación unitarias para su administración a un sujeto. La
 20 cantidad y el momento de la administración quedan a discreción del médico responsable para lograr el resultado conveniente. Las composiciones pueden formularse para la administración sistémica (tal como intravenosa) o local (tal como intratumoral). En un ejemplo, los CAR, o linfocitos T descritos que expresan un CAR, anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, conjugado, se formulan para administración parenteral, tal como
 25 administración intravenosa. Las composiciones que incluyen un CAR, o linfocito T que expresa un CAR, un conjugado, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno como se describe en la presente descripción son de uso, por ejemplo, para el tratamiento y la detección de un tumor, por ejemplo, y no a modo de limitación, un neuroblastoma. En algunos ejemplos, las composiciones son útiles para el tratamiento o la detección de un
 30 carcinoma. Las composiciones que incluyen un CAR, o linfocito T que expresa un CAR, un conjugado, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno como se describe en la presente descripción también se usan, por ejemplo, para la detección de angiogénesis patológica.

[0358] Las composiciones para la administración pueden incluir una solución del CAR, o linfocito T que expresa un CAR, conjugado, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno disuelto en un portador farmacéuticamente aceptable, tal como un portador acuoso. Puede usarse una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente no contienen ningún objeto no deseado. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales y conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares aceptables farmacéuticamente según sea necesario para aproximar condiciones fisiológicas tales como agentes tampones y de ajuste del pH, agentes de ajuste de toxicidad, agentes adyuvantes, y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de un CAR, o linfocito T que expresa un CAR, fragmento o conjugado de unión a anticuerpos o antígenos en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente sobre la base de las viscosidades de volúmenes de fluidos, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del sujeto. Los métodos reales para preparar tales formas de dosificación para su uso en terapia génica, inmunoterapia y/o terapia celular son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en la técnica.

[0359] Una composición típica para la administración intravenosa incluye aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o conjugado por sujeto por día (o la dosis correspondiente de un CAR, o linfocito T que expresa un CAR, conjugado que incluye el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno). Los métodos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen en más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 19 ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995).

[0360] Las formulaciones parenterales de liberación controlada pueden fabricarse como implantes, inyecciones oleosas o como sistemas de partículas. Para obtener una descripción general amplia de los sistemas de suministro de proteínas, véase Banga, A. J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pa., (1995). Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanosferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, como una citotoxina o

un fármaco, como núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas, y microcápsulas menores que aproximadamente 1 μm generalmente se denominan nanopartículas, nanosferas, y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 μm , de modo que solo se administran nanopartículas por vía intravenosa. Las micropartículas típicamente tienen un diámetro de alrededor de 100 μm y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., págs. 219-342 (1994); y Tice & Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, N.Y., págs. 315-339, (1992).

[0361] Los polímeros pueden usarse para la liberación controlada por iones de los CAR, o linfocitos T que expresan un CAR, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos o composiciones conjugadas descritas en la presente descripción. Varias matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en el suministro controlado de fármacos se conocen en la técnica (Langer, *Accounts Chem. Res.* 26:537-542, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloque, el poliaxámero 407, existe como un líquido viscoso pero móvil a temperaturas bajas, pero forma un gel semisólido a temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo efectivo para la formulación y el suministro sostenido de interleucina-2 recombinante y ureasa (Johnston y otros, *Pharm. Res.* 9:425-434, 1992; y Pec y otros, *J. Parent. Sci. Tech.* 44(2):58-65, 1990). Alternativamente, la hidroxiapatita se ha usado como un microportador para la liberación controlada de proteínas (Ijntema y otros, *Int. J. Pharm.* 112:215-224, 1994). Aún en otro aspecto, los liposomas se usan para la liberación controlada así como también para el direccionamiento al fármaco del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri y otros, *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa. (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para el suministro controlado de proteínas terapéuticas (véanse la patente de EE. UU. núms. 5,055,303; 5,188,837; 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028; 4,957,735; 5,019,369; 5,055,303; 5,514,670; 5,413,797; 5,268,164; 5,004,697; 4,902,505; 5,506,206; 5,271,961; 5,254,342 y 5,534,496).

Kits

[0362] En un aspecto, también se proporcionan kits que emplean los CAR descritos en la presente descripción. Por ejemplo, kits para tratar un tumor en un sujeto, o fabricar un

linfocito T-CAR que expresa uno o más de los CAR descritos en la presente descripción. Los kits incluirán típicamente un anticuerpo descrito, fragmento de unión al antígeno, conjugado, molécula de ácido nucleico, CAR o linfocito T que expresa un CAR como se describe en la presente descripción. Más de uno de los anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, conjugados, moléculas de ácido nucleico, CAR o linfocitos T que expresan un CAR descritos pueden incluirse en el kit.

[0363] El kit puede incluir un contenedor y una etiqueta o prospecto en el contenedor o asociado con este. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor contiene típicamente una composición que incluye uno o más de los anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, conjugados, moléculas de ácido nucleico, CAR o linfocitos T que expresan un CAR descritos. En varias modalidades el contenedor puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Una etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección particular.

[0364] La etiqueta o prospecto incluirá típicamente además instrucciones para el uso de un anticuerpo, fragmentos de unión al antígeno, conjugados, moléculas de ácido nucleico, CAR o linfocitos T que expresan un CAR descritos, por ejemplo, en un método para tratar o evitar un tumor o para fabricar un linfocito T CAR. El prospecto incluye típicamente instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de tales productos terapéuticos. Los materiales de instrucción pueden estar escritos, en formato electrónico (como un disquete de computadora o un disco compacto) o pueden ser visuales (como archivos de vídeo). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la cual se diseña el kit. Por lo tanto, por ejemplo, el kit puede contener adicionalmente medios para detectar una etiqueta (tales como sustratos enzimáticos para etiquetas enzimáticas, conjuntos de filtros para detectar etiquetas fluorescentes, etiquetas secundarias apropiadas tales como un anticuerpo secundario, o similares). Los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros reactivos usados rutinariamente para la práctica de un método particular. Tales kits y contenidos apropiados se conocen bien por los expertos

en la técnica.

[0365] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan en ella mediante referencia.

[0366] Las técnicas estándar pueden usarse para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación tisular (por ejemplo, electroporación, lipofección).

Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación pueden realizarse de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logran comúnmente en la técnica o como se describen en la presente. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden realizarse generalmente de acuerdo con los métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describen en varias referencias generales y más específicas que se citan y se discuten a lo largo de la presente descripción. Ver, por ejemplo, Sambrook et ál. Clonación molecular: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se incorpora en la presente mediante referencia para cualquier fin.

[0367] Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la presente descripción se incorporan mediante referencia en su totalidad.

La presente invención se comprenderá más plenamente mediante referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

[0368] Estos ejemplos se exponen para ayudar en la comprensión de la invención, pero no pretenden limitar su alcance de ninguna manera y no deben interpretarse de tal modo. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales que serían conocidos por los expertos en la técnica (técnicas de clonación molecular, etc.).

Ejemplo 1. Células inmunorreactivas que expresan conjuntamente un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un modulador de señalización del TGF- β

[0369] Este ejemplo ilustra la coexpresión de un modulador de señalización del TGF- β y un CAR mediante el uso de un sistema de modulación inmunitaria en células T humanas.. Se empaquetaron construcciones inmunomoduladoras que codifican un modulador de

señalización del TGF- β (por ejemplo, anti-TGF β y anti-TGF β R2) y un CAR antihumano CD19 (dominio de unión a antígeno extracelular SJ25C1) para administración retroviral. Phoenix A Retroviral Packaging Cell Line (ATCC) se cultivó hasta un 50-70 % de confluencia en DMEM 20 % FBS y Pen/Strep. Los complejos de ADN se prepararon mediante el uso de los plásmidos respectivos que codifican el modulador de señalización TGF- β y la construcción CAR, los plásmidos auxiliares gag-pol y pVSVG y el reactivo de transducción Eugene HD (Promega) según el protocolo del fabricante. 20-48 horas después de la transfección, se recogió el sobrenadante de virus, se dividió en alícuotas y se congeló para su uso posterior.

[0370] Se aislaron PBMC humanas de Leukopaks mediante el uso de un gradiente de densidad y se congelaron hasta su uso posterior. Los linfocitos T humanos se aislaron mediante selección magnética (kit de aislamiento de células T; Stemcell) de PBMC previamente congeladas. Los linfocitos T humanos purificados se cultivaron durante 2 días en medio Optimizer completo (medio basal Optimizer (ThermoFisher n.º A10221-01) + 26 ml de suplemento OptiMizer (ThermoFisher n.º A10484-02) + 20 ml de ICSR (CTS Immune Cell SR), ThermoFisher n.º A25961-01) + 10 ml de L-glutamina 200 mM, (Gibco 25030-081) + PenStrep, (Gibco 15140-122)) que contiene 2 ng/ml de IL-2 humana (Miltenyi) y perlas Transact de células T (Miltenyi)).

[0371] Los linfocitos T se transfirieron a placas recubiertas con retronectina (Takara; 40 ug/ml de retronectina) y se sometieron a transducción por rotación con el volumen apropiado de virus. La transducción se confirmó y cuantificó mediante citometría de flujo en diferentes momentos. En resumen, las células se incubaron con 250 ng de proteína hCD19-hFc (RnD Systems) o proteína hGCC-Fc producida internamente en tampón FACS durante 1 hora a 4 °C. Después de un lavado con tampón FACS, las células se resuspendieron con un anticuerpo secundario contra FC humano (Biolegend) durante 20 minutos a temperatura ambiente. En algunos experimentos se añadieron anticuerpos contra CD4, CD8 u otros marcadores de superficie. Las células muertas se excluyeron del análisis mediante el uso de colorante de viabilidad fijable (Thermofisher). Las células se fijaron en PBS FCS al 2 % y formaldehído al 4 % antes del análisis por citometría de flujo (FACS Fortessa, BD Biosciences). Las eficiencias de transducción se muestran como % de células vivas positivas para la tinción con CAR. Los resultados de la citometría de flujo mostraron poblaciones de 87,6 % de linfocitos, 76,1 % de singletes, 78,3 % de células CD3+ vivas y

75,8 % de células que mostraban expresión de CAR (Figura 1A-1D). Las eficiencias de transducción se muestran como % de células vivas positivas para la tinción con CAR (Figura 1E).

Ejemplo 2. Eliminación *in vitro* mediante el uso de linfocitos T CAR humanas moduladoras

del TGF- β

[0372] Este ejemplo ilustra *in vitro* muerte por linfocitos T CAR humanas que coexpresan un modulador de señalización del TGF- β . *in vitro* la muerte por linfocitos T CAR humanas blindadas es comparable a las linfocitos T CAR no blindadas

[0373] Las células Raji (ATCC CD19 positivo) o Raji CD19ko (negativo para CD19 humano) se tiñeron con colorante de proliferación efluor 450 (Thermofisher) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se sembraron en placas de 96 pocillos al menos 2 horas antes de la adición de los linfocitos T CAR moduladores del TGF- β descritos en el Ejemplo 1. Se añadieron linfocitos T CAR en relaciones efector:diana 0:1, 0,3:1, 1:1, 3:1, 9:1 y las células T solas se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se realizó la tinción con FACS mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluorocromo contra CD107a humano (LAMP-1) (Biolegend), TCR α/β (Biolegend) y anticuerpo CD4 humano (Biolegend). Las células se incubaron con anticuerpos durante 30 minutos a 4 °C, se lavaron con PBS y se tiñeron con colorante de viabilidad fijable (Thermofisher) según el protocolo del fabricante. Las células C se lavaron con tampón de unión de anexina V 1x (Biolegend) y se tiñeron con anexina V FITC. Las células se fijaron en cytofix (BD Biosciences) antes de la adquisición en un FACS Fortessa (BD Biosciences). Células TGF- β moduladoras CD19 CAR-T, demostradas *in vitro* matar contra células Raji CD19 positivas (Figura 2A) pero no contra células de control negativas CD19 (Raji CD19ko) (Figura 2B).

Ejemplo 3. Secreción de moduladores del TGF- β de células inmuno-respuestas

[0374] Este ejemplo demuestra que las linfocitos T CAR que modulan TGF- β secretan moduladores del TGF- β coexpresados (por ejemplo, anti-TGF- β que se une a TGF- β y anti-TGF β R2 que se une a TGF β R2).

[0375] El sobrenadante de linfocitos T CAR moduladoras del TGF- β se analizó mediante ELISA para detectar anticuerpos anti-TGF- β y anti-TGF β R2. Las placas Maxisorp de 96 pocillos se recubrieron con TGF- β humano recombinante (4; sistema RnD μ g/ml) o hTGF β R2-Fc (0,1 mg/ml; sistema RnD) en 100 μ l de tampón de recubrimiento durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con tampón de lavado 1x y se bloquearon durante 1

hora con diluyente reactivo a temperatura ambiente. Se añadió sobrenadante de CAR-T, TGF β R2-flag recombinante o anticuerpo TGF- β -flag recombinante y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.

[0376] Después de otro paso de lavado, se añadió el anticuerpo marcador de bandera conjugado con HRP y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se añadió sustrato TMB durante 10 a 20 minutos. La reacción se detuvo mediante el uso del reactivo Stop y las placas se leyeron a 450 nm mediante el uso de un lector de placas Pherastar. ELISA mediante el uso de TGF-b recubierto detectó niveles altos del TGF-b scFv VH-VL1 y TGF-b scFv VH-VL2 en comparación con TGF-b scFv VL-VH mediante el uso de anticuerpos anti-marca HRP para la detección de aglutinante (Figura 3A). ELISA mediante el uso de TGFbR2-Fc recubierto detectó altos niveles del TGFbR2 scFv VH-VL, TGFbR2 scFv VL-VH y hTGFbR2 VH1 de CAR-T humano pero no pudo detectar mTGFbR2 VH1 (Figura 3B). Los aglutinantes del TGF- β y los aglutinantes del TGF β R2 fueron secretados por linfocitos T CAR moduladores del TGF- β y se unen a su antígeno afín.

Ejemplo 4. Las linfocitos T CAR humanas secretan anticuerpos neutralizantes contra TGF- β / TGF β R2

[0377] Este ejemplo ilustra la presencia de anticuerpos neutralizantes contra TGF- β /TGF β R2 en sobrenadantes de T CAR que modulan TGF- β .

[0378] La evaluación funcional de los aglutinantes bloqueadores del TGF- β en el sobrenadante de las linfocitos T CAR se realizó mediante el uso de células indicadoras SBE-Luc (células HEK293 que expresan luciferasa de luciérnaga bajo el control del Smad Binding Element (SBE) (BPS Biosciences)), diseñadas para monitorear la actividad de la vía de señalización TGF- β /SMAD. Las proteínas TGF- β se unen a sus receptores afines en la superficie celular, iniciando una cascada de señalización que conduce a la fosforilación y activación de SMAD2 y SMAD3, que luego forman un complejo con SMAD4. El complejo SMAD se transloca al núcleo y se une al elemento de unión SMAD (SBE), lo que lleva a la transcripción y expresión de genes sensibles a TGF- β /SMAD. La presencia de aglutinantes de bloqueo se detectó por su capacidad para inhibir la expresión de luciferasa inducida por TGF- β en células indicadoras SBE-Luc. Un ensayo ilustrativo para evaluar la potencia para inhibir la actividad informadora inducida por TGF- β se realizó como sigue.

[0379] Las células SBE-Luc se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con Poly-D Lysine a una concentración de 1×10^5 células/pocillo en 100 μ l de medio fresco (X-VIVO15

que contiene 1x Penn/Strep) e incubado durante 4 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. El sobrenadante de las linfocitos T CAR o sus diluciones se mezcló con un volumen equivalente del TGF-β (4 ng/ml en X-VIVO15) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir que el TGF-β se acomplejara con el TGF-β contenido en el sobrenadante CAR-T. Se añadieron 100 µl de la mezcla a las células indicadoras SBE-Luc por duplicado y se incubaron durante la noche a 37 °C y 5 % de CO₂. La concentración final del TGF-β fue de 1 ng/ml. Cada experimento incluía una curva de titulación de diluciones crecientes de anticuerpo TGF-β (1D11 (BioXcell) o ligantes del TGF-β o ligantes del TGFβR2) en presencia de 1 ng/ml del TGF-β.

[0380] Al día siguiente, se extrajeron 100 µl del sobrenadante del cultivo y se añadieron 100 µl del reactivo de detección que contenía Luciferina-D (ONE-Step™ Luciferase Assay System). Las células se resuspendieron y se transfirieron a una placa de detección blanca y se midió la luminiscencia mediante el uso de un lector de placas Pherastar. La actividad de luciferasa se registró como CPM. Los datos se analizaron mediante el uso de MS Excel o prisma Graphpad. El ajuste de regresión no lineal se realizó mediante el uso de la dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable) del prisma Graphpad. Se calcularon los valores de IC50.

[0381] La actividad inhibitoria (%) se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación:

Inhibición (%) = (1- CPM de muestra / CPM max del TGF-β (1ng/ml) muestra tratada) X 100

[0382] Los resultados mostraron que el sobrenadante de las linfocitos T CAR que secretan construcciones TGF-β scFv VH-VL1 (SEQ ID NO: 1) y TGF-β scFv VH-VL2 (SEQ ID NO: 2) inhibe la señalización del TGF-β (Figura 4). Se diseñaron y seleccionaron construcciones adicionales mediante el uso de un ensayo indicador de luciferasa para la secreción de aglutinantes multiméricos contra TGF-β o TGFβR2 (Figura 5 y Figura 6). Se identificaron linfocitos T CAR moduladoras del TGF-β que secretaban anticuerpos multiméricos contra TGF-β y TGFβR2. Los aglutinantes del TGF-β multiméricos pueden ser secretados por linfocitos T CAR humanas e inhibir la señalización del TGF-β independientemente del enlazador. Se analizaron cuatro enlazadores diferentes como se muestra en la siguiente figura. Se observaron resultados similares mediante el uso de linfocitos T CAR anti-GCC humanas (datos no mostrados).

Ejemplo 5. Las linfocitos T CAR moduladoras del TGF-β secretan aglutinantes multiméricos contra TGF-β o TGFβR2

[0383] Este ejemplo ilustra la selección e identificación de linfocitos T CAR de ratón que secretan aglutinantes multiméricos contra TGF- β o TGF β R2. Para generar linfocitos T CAR de ratón, Platinum-E Retroviral Packaging Cell Line se cultivó hasta un 50-70 % de confluencia en DMEM 20 % FBS y Pen/Strep. Los complejos de ADN se prepararon mediante el uso de los plásmidos del sistema de modulación inmunitaria que codifican la construcción CAR y el modulador TGFB (por ejemplo, monómero anti-TGF-b scFv, dímero anti-TGF-b scFv), una construcción de empaquetamiento y el reactivo de transducción Eugene HD de acuerdo con el protocolo del fabricante. . La solución se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se añadieron 850 μ l de complejo por cada 10 cm.² plato de células. Las células T de ratón se aislaron mediante selección magnética mediante el uso de un kit de aislamiento de células T de los bazo de ratones Balb/c o C57BL/6, respectivamente. Los linfocitos T de ratón purificados se cultivaron durante 2 días con perlas de activador de linfocitos T de ratón (relación 1:1) en RPMI FCS inactivado con calor al 10 %, Pen/Strep e IL-2 de ratón (30 U/ml). El virus se recogió aproximadamente 48 horas después de la transfección y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,4 μ m. Las células T se transfirieron a placas recubiertas con retronectina (recubiertas con 40 μ g/ml de retronectina según el protocolo del fabricante) y se sometieron a transducción por rotación con el volumen apropiado de virus. La transducción se confirmó y cuantificó mediante citometría de flujo en diferentes momentos.

[0384] Las células se incubaron con 250 ng de proteína hCD19-hFc en tampón FACS durante 1 hora a 4°C. Después de un lavado con tampón FACS, las células se resuspendieron con un anticuerpo secundario contra FC humano durante 20 minutos a temperatura ambiente. En algunos experimentos, se agregaron anticuerpos contra CD4, CD8 u otros marcadores de superficie. Las células muertas se excluyeron del análisis mediante el uso de colorante de viabilidad fijable. Las células se fijaron en PBS FCS al 2%, formaldehído al 4% antes del análisis por citometría de flujo (FACS Fortessa). Las eficiencias de transducción se muestran como porcentaje (%) de células vivas positivas para la tinción con CAR.

[0385] Los resultados de la citometría de flujo mostraron la proporción relativa de células T no blindadas, monómero del TGF- β , dímero del TGF- β y células no transducidas. El sobrenadante de linfocitos T CAR de ratón recolectadas d+2 después de la transducción se sondeó para inhibir la señalización del TGF-b en el ensayo informador SBE-Luc TGF-b

(método como se describe en el Ejemplo 4). El sobrenadante del monómero y dímero TGF- β scFv secretor de CAR-T de ratón inhibió la señalización del TGF- β en función de la actividad indicadora de luciferasa. Se identificaron linfocitos T CAR de ratón que secretaban anticuerpos multiméricos contra TGF- β y TGF β R2.

- 5 **[0386]** El sobrenadante se recogió dos días después de la transducción y se congeló a -80°C hasta que se usó para ELISA. ELISA se realizó como se describe en el Ejemplo 3. Se usó proteína TGF β R2-Fc recombinante humana para capturar aglutinantes contra TGF β R2 humano y se usó proteína TGF β R2-Fc recombinante de ratón para probar la unión de aglutinantes del TGF β R2 a TGF β R2 de ratón. La unión se detectó mediante el uso de anticuerpos HRP anti-flag y el sustrato respectivo. Como se muestra en la Figura 7, secreción de los aglutinantes monómero y dímero hTGF β R2-VH2 y hTGF β R2-VH3 y monómero y dímero TGF β R2 scFv VH-VL y su unión a TGF β R2 humano. Ninguno de los aglutinantes de los sobrenadantes analizados se unió a TGF β R2 de ratón, lo que confirma la especificidad por TGF β R2 humano.

15 **Ejemplo 6. Eficacia antitumoral in vivo de linfocitos T CAR secretoras de moduladores de señalización del TGF- β**

- [0387]** Este ejemplo ilustra *en vivo* eficacia antitumoral de linfocitos T CAR secretoras de mAb anti-TGF- β . Las linfocitos T CAR blindadas de ratón (que expresan conjuntamente CAR anti-CD19 humano y un modulador de señalización TGF β) inhiben el crecimiento del tumor EMT6-hCD19 singénico mejor que las linfocitos T CAR no blindadas. Además, las linfocitos T CAR blindadas reducen la metástasis hepática y pulmonar. Se generó una línea celular de carcinoma de mama EMT6 que sobreexpresa CD19 humano como antígeno diana CAR-T y luciferasa de luciérnaga. Las células EMT6 se transdujeron con virus que portaban un plásmido que codificaba CD19 humano bajo el control de un promotor EF1a y resistencia a la puromicina. Las células EMT6-hCD19 se seleccionaron positivamente mediante el uso de puromicina y se purificaron adicionalmente mediante clasificación FACS. Se transdujeron células EMT6-hCD19 con virus que portaban un plásmido que codificaba luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor EF1a y resistencia a la neomicina (Amsbio) a 5×10^7 UFI/mL; MOI = 10, en presencia de polibreno. Las células EMT6-hCD19-Fluc se seleccionaron positivamente mediante el uso de G418 (500 μ g/ml).

[0388] Se inocularon ratones Balb/c hembra de 6-16 semanas de edad (Jackson Labs) con $0,2 \times 10^6$ células tumorales EMT6-hCD19-Fluc viables en la almohadilla de grasa mamaria

(ortotópica). 6 días después de la implantación, el tamaño del tumor alcanzó unos 50 mm³ y los ratones se aleatorizaron en grupos de tratamiento con un tamaño tumoral promedio similar (promedio ~ 50 mm³) y tratados con ciclofosfamida (CPA; 200 mg/kg ip). Al día siguiente, se inyectaron en la vena de la cola 500 000 linfocitos T CAR de ratón de ratones congénicos CD45.1 Balb/c. El grupo 1 recibió células T no transducidas, el grupo 2 recibió linfocitos T CAR y el grupo 3 recibió anti-TGF-β scFv VH-VL1 secretoras de linfocitos T CAR. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad.

[0389] El tamaño del tumor se midió dos veces por semana y el volumen del tumor se calculó mediante la fórmula: volumen del tumor (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236 (Figura 8). Cualquier ratón con tumores de más de 2000 mm³ o se sacrificaron tumores ulcerosos. La eficacia antitumoral se evaluó como la disminución del tamaño del tumor en comparación con los ratones de control a los que se inyectaron células T no transducidas. Los respondedores completos se definieron como ratones sin tumores detectables.

[0390] Las linfocitos T CAR que secretan el aglutinante del TGF-β mostraron una alta eficacia antitumoral en relación con las linfocitos T CAR no blindadas o las linfocitos T CAR no transducidas. Se obtuvieron imágenes de hígados y pulmones para detectar células tumorales que expresan luciferasa de luciérnaga inyectando luciferina e imágenes mediante IVIS. La solución de D-Luciferina (D-Luciferina, Sal de Potasio Vivo Glo tm Luciferina) se preparó a 15 mg/ml y se usó a 150 mg/kg. Los ratones tratados con linfocitos T CAR que secretan aglutinantes del TGF-β fueron capaces de reducir la metástasis hepática y pulmonar (Figura 8A-8E).

[0391] CAR-T de ratón contra CD19 humano que secreta un anticuerpo inhibidor contra TGF-β(TGF-b scFv VH-VL1) inhiben el crecimiento del tumor singénico EMT6-hCD19 mejor que las linfocitos T CAR no blindadas y reducen la metástasis en el hígado y los pulmones. El número de linfocitos T CAR se había valorado previamente para dar un efecto subóptimo para CAR-T no blindado para identificar la actividad mejorada de las linfocitos T CAR blindadas.

Ejemplo 7. Las linfocitos T CAR blindadas de ratón que secretan el dominio extracelular (ECD) del TGFbR2 inhiben la señalización del TGFb

[0392] SBE-Luc TGF-β Se realizó un ensayo reportero comparando el sobrenadante de CAR-T de ratón acorazado que secreta diferentes TGF-β trampas de ligandos (TGF-β scFv VH-VL1 a TGFbR2 ECD monómeros, homodímeros (Figura 9A) y heterodímeros (Figura

9B)) a CAR-T sin blindaje. SBE-Luc TGF- β El ensayo reportero mostró que el sobrenadante de CAR-T de ratón blindado contra CD19 humano que secreta TGF β El dímero del dominio extracelular (ECD) R2, pero no los monómeros, inhibe bien y muestra una inhibición comparable a la del TGF- β dímero scFv VH-VL1. Los sobrenadantes se recogieron 2 días después de la transducción. Inhibición del TGF β Heterodímero R2 ECD que incluye un TGF β R2 ECD y TGF β Se evaluó el ECD R1. identificó un TGF β Heterodímero R2 ECD que inhibe la señalización del TGF-b con más potencia que TGF- β scFV VH-VL1. TGF ilustrativo β Las secuencias de R2 ECD se muestran en la Tabla 4.

10 *Tabla 4. TGF ilustrativo β Secuencias ECD R2*

monómero TGF β R2 ECD		
METDTLLLWVLLLWPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVM ASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNI TLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYT TSSPDL (SEQ ID NO: 37)		
Dímero TGF β R2 ECD		
METDTLLLWVLLLWPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVM ASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNI TLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYT TSSPDLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGIPPHVPKS DVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQ KSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVM KEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL (SEQ ID NO: 39)		
mTGF β R2ECD	monómero	2
IPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVR LSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDA ASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL (SEQ ID NO: 32)		
huTGF β R1+2 ECD dímero1		
LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTG SVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVEGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNG AVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVAVWRKNDENITLETVCH		

DPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 33)
huTGFbR1+2 ECD dímero2
QCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVFCAPSSKTGS VTTTYCCNQDHCNNGGGGSAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE CNDNIIFSE (SEQ ID NO: 34)
mTGFbR1+2 ECD dímero1
LQCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVFCAPSSKTG AVTTTYCCNQDHCNKIELPTTGPFSEKQSAGLGPVELGGGGSIPPHVPSVNSDVMAS DNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITL ETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPD (SEQ ID NO: 35)
huTGFbR2 ECD monómero1
LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVFCAPSSKTG SVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVE (SEQ ID NO: 40)
huTGFbR2 ECD monómero2
QCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVFCAPSSKTGA VTTTYCCNQDHCNNGGGGSAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEV CVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKE (SEQ ID NO: 36)

Ejemplo 8. Eficacia antitumoral de las linfocitos T CAR blindadas que secretan un modulador de señalización del TGF- β

[0393] Este ejemplo ilustra el relativo *en vivo* eficacia antitumoral de mAb anti-TGF β o linfocitos T CAR secretoras del TGF β R2-ECD.

[0394] Ratón CAR-T que secreta TGF β El dímero R2 ECD1+2 muestra una función antitumoral mejorada in vivo en comparación con las linfocitos T CAR no blindadas. Se inocularon ratones Balb/c hembra de 6-16 semanas de edad (Jackson Labs) con $0,2 \times 10^6$ células tumorales EMT6-hCD19-Fluc viables en la almohadilla de grasa mamaria (ortotópica). 6 días después de la implantación, el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 50 mm³ y los ratones se aleatorizaron en grupos de tratamiento con un tamaño de tumor promedio similar (promedio ~50 mm³; n = 8 por grupo) y se trataron con

ciclofosfamida (CPA; 200 mg/kg ip). Al día siguiente, se inyectaron en la vena de la cola 2 millones de linfocitos T CAR de ratón de ratones congénicos CD45.1 Balb/c. El grupo 1 recibió células T de control no transducidas, el grupo 2 recibió linfocitos T CAR no blindadas, el grupo 3 recibió linfocitos T CAR secretoras de dímero ECD TGFbR1+2 y el grupo 4 recibió anti-TGF- sistémico.β anticuerpo (clon 1D11.16.8; 10 mg/kg; 3 inyecciones/semana; iv). Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana y el volumen del tumor se calculó mediante la fórmula: volumen del tumor (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2000 mm³ o tumores ulcerados fueron sacrificados siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se evaluó como la disminución del tamaño del tumor en comparación con los ratones de control a los que se inyectaron células T no transducidas. Los respondedores completos se definieron como ratones sin tumores detectables.

[0395] CAR-T de ratón contra CD19 humano que secreta un TGF-β ligand trap (mTGFbR2 ECD1+2 dimer1) inhibe el crecimiento del tumor EMT6-hCD19 singénico mejor que las linfocitos T CAR no blindadas, lo que induce 3 respuestas completas en comparación con ninguna respuesta completa en ratones de control que recibieron CAR-T no blindados o células T no transducidas o fueron tratados con anti-TGF- sistémicoβ anticuerpo (1D11, 10 mg/kg, 3 veces por semana iv). (Figura 10)

Ejemplo 9. Eficacia antitumoral de las linfocitos T CAR blindadas que secretan un modulador de señalización del TGF-β en un modelo de tumor singénico (MC38-hCD19)

[0396] Este ejemplo ilustra el relativo *en vivo* eficacia antitumoral de mAb anti-TGFβ o linfocitos T CAR secretoras del TGFβ R2-ECD. Función mejorada de linfocitos T CAR de ratón blindadas con mAb anti-TGF-b (TGF-b scFv VH-VL1) un modelo de tumor singénico diferente (MC38-hCD19).

[0397] Se generó una línea celular de cáncer colorrectal MC38 que sobreexpresa CD19 humano como antígeno diana CAR-T y luciferasa de luciérnaga y se usó para obtener imágenes. En resumen, las células MC38 se transdujeron con virus que portaban un plásmido que codificaba CD19 humano bajo el control de un promotor EF1a y resistencia a la puromicina (CD19_FL_WT_pLVX-EF1a-IRES-Puro). Las células MC38-hCD19 se seleccionaron positivamente mediante el uso de puromicina. Se transdujeron células MC38-hCD19 con virus que portaban un plásmido que codificaba luciferasa de luciérnaga bajo el

control de un promotor EF1a y resistencia a neomicina (Amsbio, CAT# LVP435-PBS, a 5×10^7 IFU/mL; MOI = 10) en presencia de polibreno. Las células MC38-hCD19-Fluc se seleccionaron positivamente mediante el uso de G418 (geneticina).

[0398] Se inocularon ratones hembra C57BL/6 de 6-16 semanas de edad (Jackson Labs)

5 con $0,2 \times 10^6$ células tumorales MC38-hCD19-Fluc viables s.c. Siete días después de la implantación, el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 50 mm³ y los ratones se aleatorizaron en grupos de tratamiento con un tamaño de tumor promedio similar (promedio ~50 mm³; n=8 por grupo) y se trataron con ciclofosfamida (CPA; 200 mg/kg i.p.). Al día siguiente, se inyectaron en la vena de la cola 100 000 linfocitos T CAR de ratón (o células
10 T no transducidas como control negativo) de ratones congénicos CD45.1 C57BL/6. El grupo 1 recibió células T no transducidas. El grupo 2 recibió linfocitos T CAR no blindadas. El grupo 3 recibió anti-TGF- β linfocitos T CAR secretoras (TGF-b scFv VH-VL1). Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana y el volumen del tumor se calculó mediante la fórmula:
15 volumen del tumor (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Cualquier ratón con tumores de más de 2000 mm³ o tumores ulcerados fueron sacrificados siguiendo el protocolo de sanidad animal del instituto. La eficacia antitumoral se evaluó como la disminución del tamaño del tumor en comparación con los ratones de control a los que se inyectaron células T no transducidas. Los respondedores completos se definieron como ratones sin tumores
20 detectables.

[0399] linfocitos T CAR que secretan un aglutinante inhibidor contra TGF- β (TGF-b scFv VH-VL1) mostró una eficacia superior a CAR-T no blindado, induciendo 7 respuestas completas entre 8 ratones tratados en comparación con respuestas incompletas en los grupos de control que recibieron una cantidad igual de CAR-T no blindado o T no
25 transducido células. (Figura 11)

Ejemplo 10. linfocitos T CAR que secretan un TGF- β el modulador de señalización mejora la activación de la respuesta inmune del hospedero

[0400] Este ejemplo demuestra que RNA Seq mostró una activación mejorada de la respuesta inmune del hospedero por parte de las linfocitos T CAR que secretan un
30 aglutinante contra TGF- β .

[0401] Se inocularon ratones Balb/c hembra de 6-16 semanas de edad (Jackson Labs) con $0,2 \times 10^6$ células tumorales EMT6-hCD19-Fluc viables en la almohadilla de grasa mamaria

(ortotópica). 6 días después de la implantación, el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 50 mm³ y los ratones se aleatorizaron en grupos de tratamiento con un tamaño de tumor promedio similar (promedio ~50 mm³; n = 8 por grupo) y se trataron con ciclofosfamida (CPA; 200 mg/kg ip). Al día siguiente, se inyectaron en la vena de la cola 2 millones de linfocitos T CAR de ratón de ratones congénicos CD45.1 Balb/c. El grupo 1 recibió células T de control no transducidas, el grupo 2 recibió linfocitos T CAR no blindadas, el grupo 3 recibió anti-TGF-βscFv VH-VL1 secretoras de linfocitos T CAR. El grupo 4 fue tratado con anti-TGF-β sistémico anticuerpo (clon 1D11.16.8; BioXcell; 10 mg/kg; 3 veces por semana 1.v.) y el grupo 5 recibió anticuerpo de control de isotipo (clon MOPC21; BioXcell; 10 mg/kg; 3 veces por semana 1.v.). Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana y el volumen del tumor se calculó mediante la fórmula: volumen del tumor (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236.

[0402] Los ratones se sacrificaron el día +12 y los tumores se recogieron, se congelaron instantáneamente y se mantuvieron a -80°C. Se extrajo el ARN y se realizó RNA-Seq seguido de análisis computacional como se muestra en la Figura 12.

[0403] Tumores de ratones que recibieron TGF-βscFv VH-VL1 que secretaba CAR-T había aumentado significativamente las puntuaciones de las células T infiltrantes de tumores (CD3d+, CD3e+, CD3g+) y, en particular, las células T CD8+ (CD8a+) y las células T citotóxicas (GzmB+) en comparación con los ratones de los otros grupos (FIG . 13)

[0404] Las puntuaciones de enriquecimiento de ssGSEA mostraron un aumento de las firmas de células T y las firmas de IFNγ en tumores de ratones que recibieron TGF-βscFv VH-VL1 que secreta CAR-T, lo que indica una mayor infiltración de linfocitos T CAR y/o activación del sistema inmunitario endógeno. El aumento de firmas de endotelio activado, coestimulación y presentación de antígenos en tumores de ratones que recibieron TGF-βscFv VH-VL1 que secreta CAR-T muestra claramente la activación del sistema inmunitario endógeno. Por lo tanto, el blindaje de las linfocitos T CAR con anticuerpos bloqueadores (u otros aglutinantes) que inhiben el TGF-β eficacia antitumoral de la vía, al menos parcialmente mejorando la respuesta inmune endógena. (Figura 14)

Ejemplo 11. FACS de muestras tumorales de ratones EMT6-hCD19 tratados con linfocitos T CAR no blindadas

[0405] Se inocularon ratones Balb/c hembra de 6-16 semanas de edad (Jackson Labs) con

0,2x10⁶ células tumorales EMT6-hCD19-Fluc viables en la almohadilla de grasa mamaria (ortotópica). 6 días después de la implantación, el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 50 mm³ y los ratones se aleatorizaron en grupos de tratamiento con un tamaño de tumor promedio similar (promedio ~50 mm³; n = 8 por grupo) y se trataron con ciclofosfamida (CPA; 200 mg/kg ip). Al día siguiente, se inyectaron en la vena de la cola 2 millones de linfocitos T CAR de ratón de ratones congénicos CD45.1 Balb/c. El grupo 1 recibió células T de control no transducidas, el grupo 2 recibió linfocitos T CAR no protegidas, el grupo 3 recibió linfocitos T CAR secretoras de monómero anti-TGF- β scFv VH-VL1. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana y el volumen del tumor se calculó mediante la fórmula: volumen del tumor (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236.

[0406] Los ratones se sacrificaron el día +7 y los tumores se recolectaron, pesaron y procesaron para el análisis FACS. En resumen, los tumores se cortaron en trozos pequeños y se digirieron mediante el uso de kits de disociación de tumores de ratón (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. Las muestras se resuspendieron en PBS FCS al 2 %, se filtraron y se sembraron en una placa de 96 pocillos para la tinción FACS. Los receptores Fc se bloquearon (TruStain FcX (anticuerpo anti-CD16/32 de ratón); Biolegend) y el CAR se marcó durante 1 hora a 4 °C mediante el uso de rhuCD19 (RnD Systems) y luego se marcó para hCD19-Fc mediante el uso de anti-human IgG Fc anticuerpo, marcadores de superficie que incluyen TCRA/b, CD8a, CD4, CD25, CD62L, CD11b, Gr1, CD11c, CD45.1 y CD45, las células vivas se tiñeron con colorante de viabilidad fijable (ebioscience) y los antígenos intracelulares que incluyen GzmB, Ki67 y FoxP3 se tiñeron teñido con eBioscience Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermofisher). Las muestras se filtraron y adquirieron en un citómetro de flujo BD Fortessa.

[0407] Como se muestra en la Figura 15, la tinción FACS mostró una disminución de células tumorales hCD19+ en muestras de ratones que recibieron CAR-T que secretaba TGF- β scFv VH-VL en comparación con los controles que recibieron células no transducidas o CAR-T sin blindaje y un aumento en la infiltración de células T (por mg de tejido tumoral). La selección de células T CD45.1+ y CD45.1- muestra en particular un aumento en la infiltración de células T endógenas (CD45.1-). Las linfocitos T CAR transferidas (CD45.1+) de estas muestras tenían un mayor nivel de expresión de CAR y las células T CD8+ mostraron una mayor expresión de CD25, lo que indica un aumento de la activación. Las

células T CD8+ de las células T hospedero (CD45.1-) tenían una mayor expresión de GzmB, lo que indica una mayor citotoxicidad. En resumen, estos datos de FACS indican que el blindaje de las linfocitos T CAR con aglutinantes contra TGF- β mejora la función de las linfocitos T CAR y la respuesta inmune endógena.

5 **Ejemplo 12. El modelo de xenoinjerto muestra una función mejorada de las células GCC-CAR-T humanas blindadas con anti-TGF- β o anti-TGF β anticuerpos bloqueadores de R2**

[0408] Ratones NSG hembra de 6-16 semanas de edad (Jackson Labs) se inocularon por vía subcutánea con 2×10^6 células tumorales GSU viables. 7 días después de la implantación, el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 50 mm³ y los ratones se
10 aleatorizaron en grupos de tratamiento con un tamaño de tumor promedio similar (promedio de ~50 mm³; n = 6 por grupo). Al día siguiente, se inyectaron 500 000 o 100 000 células GCC CAR-T humanas en la vena de la cola. El grupo 1 recibió células T de control no transducidas, el grupo 2 recibió linfocitos T CAR no blindadas, el grupo 3 recibió monómero anti-TGF- β scFv VH-VL1 que secreta linfocitos T CAR, el grupo 4 recibió anti-
15 TGF β Monómero R2 VH3 y grupo 5 anti-TGF β Dímero R2 VHH que secreta células CAR T. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana para controlar la toxicidad. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana y el volumen del tumor se calculó mediante la fórmula: volumen del tumor (mm³) = largo x ancho x alto x 0,5236. Células GCC-CAR-T blindadas con anti-TGF- β o anti-TGF β Los anticuerpos bloqueadores de R2
20 mostraron una respuesta más rápida que el control CAR-T no blindado con 500 000 células transferidas y una eficacia antitumoral mejorada con 100 000 linfocitos T CAR transferidas. (Figura 16).

[0409] Concentraciones tumorales y plasmáticas del TGF β los moduladores se determinaron mediante el uso de un ensayo de LC/MS de captura inmune anti-Flag. Como
25 se muestra en la Figura 17A-17D, Cantidades bajas del TGF- secretado β anticuerpo o anticuerpo anti-TGF β R2 en la circulación de ratones tratados con linfocitos T CAR blindadas. Se recogió plasma de ratones tratados con la cantidad indicada de linfocitos T CAR anti-GCC blindadas o no blindadas mediante el uso de tubos con EDTA.

[0410] Como se muestra en la Figura 20A-20C, las linfocitos T CAR blindadas también
30 demostraron actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto GSU, HT55 y MDA-MB-231-FP4 Luc positivos para GCC.

[0411] Se evaluó una metástasis hepática mediante inyección intraesplénica de células

tumorales HT55 seguida de inyección intravenosa de linfocitos T CAR. Las linfocitos T CAR blindadas ralentizaron la metástasis en el hígado en relación con el control de isotipo (Figura 21A-21C)

Ejemplo 13. Repetir la estimulación antigénica en tumores GCC positivos

5 **[0412]** 100 000 linfocitos T CAR anti-GCC sin blindaje o blindadas (que expresan conjuntamente un CAR anti-GCC y un TGF β modulador (por ejemplo, TGF β R2-VHH)) se cocultivaron por duplicado con 200 000 células tumorales parentales HT29-GCC o HT29 (negativas para GCC) en presencia o ausencia del TGF- β (1 ng/ml o 10 ng/ml). Cada 3-4 días, la mitad de las linfocitos T CAR por pocillo se transfirieron a una nueva placa de células
10 tumorales en las mismas condiciones (con o sin TGF- β 1 ng/ml o 10 ng/ml). Los sobrenadantes se recogieron y congelaron para su posterior evaluación. Las células se evaluaron para el recuento de células y el análisis de tinción FACS

[0413] Las células tumorales se evaluaron mediante el uso de CellTiterGlo (Promega) según el protocolo del fabricante. Las placas se analizaron mediante el uso de un lector de placas
15 Pherastar. El porcentaje de muerte se evaluó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de destrucción} = (1 - (\text{señal del pozo probado} / \text{señal de los pozos de control})) * 100$$

[0414] Los pocillos de control contenían células tumorales cocultivadas con células T no transducidas del mismo donante utilizado para las linfocitos T CAR. La tinción FACS se realizó una vez por semana mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluorocromo
20 contra CD4, CD8, CD25 humanos y los marcadores de agotamiento PD-1, TIM-3, Lag-3 y anticuerpos TIGIT (Biolegend). Las células muertas se excluyeron mediante el uso de colorante de viabilidad fijable efluor 506 (Thermofisher; según el protocolo del fabricante). Las células que expresan CAR se incubaron con GCC-hFc durante 1 hora a 4 °C, se lavaron con PBS FCS al 2 % y se detectaron con un anticuerpo IgG antihumano de ratón secundario
25 (30 minutos, 4 °C).

[0415] Después de varias rondas de reestimulación con células diana, simulando la activación crónica del antígeno, TGF- β induce la inhibición de la función de las linfocitos T CAR. Solo las linfocitos T CAR secretan el TGF β modulador (por ejemplo, TGF β dímero R2 VHH) están protegidos de los efectos inhibidores del TGF- β (1 ng/ml o 10 ng/ml)
30 estimulación (Figura 18A-18C). El efecto inhibitorio sobre la eliminación de CAR-T se correlaciona con la inhibición de la proliferación y la inducción del marcador de agotamiento Lag3.

Ejemplo 14. Repetir la estimulación antigénica en tumores positivos a la mesotelina (Msln)

[0416] Aproximadamente 100 000 linfocitos T CAR anti-Msln derivadas de iPSC, que coexpresan un CAR contra Msln junto con un modulador TGFβ (por ejemplo, TGFβR2-VH o dnTGFbR2) o un control VH contra GFP (Msln-control VH) se cocultivaron en se duplica
 5 con 40 000 células tumorales MiaPaca-2 que sobreexpresan Msln humana, en presencia o ausencia del TGF-β (R&Sistemas D, 10 ng/ml). El TGFβR2-VH fue secretado por la célula CAR-T mientras que el dnTGFbR2 estaba unido a la membrana de la célula CAR-T. Cada 3-4 días, la mitad de las linfocitos T CAR por pocillo se transfirieron a una nueva placa de células tumorales en las mismas condiciones (con o sin TGF-β 10 ng/ml). Los
 10 sobrenadantes se recogieron y congelaron para su posterior evaluación. Las linfocitos T CAR se contaron mediante citometría de flujo y el fenotipado FACS se realizó en puntos de tiempo seleccionados (**Figura 22A**).

[0417] La viabilidad de las células tumorales se evaluó mediante el uso de CellTiterGlo (Promega) según el protocolo del fabricante. Las placas se analizaron mediante el uso de
 15 un lector de placas Pherastar. El porcentaje de muerte se evaluó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de destrucción} = 1 - \left[\frac{(\text{señal del pozo probado})}{(\text{señal de los pozos de control})} \right] \times 100$$

[0418] Los pocillos de control contenían células tumorales solas sin células efectoras (es decir, CAR-T). El porcentaje de citotoxicidad se muestra en **Figura. 22B**.

[0419] Los recuentos de células se realizaron excluyendo las células muertas mediante el uso de colorante Sytox Red (Thermofisher, según el protocolo del fabricante) y se adquirieron volúmenes iguales de suspensión celular en un citómetro de flujo Fortessa (BD Biosciences) mediante el uso de una unidad HTS. Las linfocitos T CAR vivas se contaron seleccionando células vivas, células individuales y tamaño. Los resultados se extrapolaron
 25 para obtener el número de células por pocillo.

[0420] Se observó que después de varias rondas de reestimulación con células diana, simulando la activación crónica del antígeno, el TGF-β inducía la inhibición de la función de las linfocitos T CAR (es decir, la muerte) e inhibía la proliferación de linfocitos T CAR. Solo las linfocitos T CAR que expresan el modulador del TGFβ (por ejemplo, secreción de dímero de VH del TGFβR2 o expresión de dnTGFbR2 unido a la membrana), pero no un VH de control, estaban protegidas de los efectos inhibidores del TGF-β (10 ng/ml).
 30

Tabla de secuencias

[0421] La Tabla 5 más abajo proporciona descripciones y secuencias descritas en la presente descripción.

Tabla 5. Tabla de secuencias

Descripción/SE Q ID NO	Secuencia
SEQ ID NO: 1 TGFb scFv VH- VL1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ GLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGGSGGGGSG GGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKR
SEQ ID NO: 2 TGFb scFv VH- VL2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ GLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGGSGGGGSG GGGSETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKR
SEQ ID NO: 3 TGFb scFv VL- VH	ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYADSPITFGQGTRLEIKRGGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGA EVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVI PIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCAS TLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 4 TGFbR2 scFv VH-VL	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWRQPPG KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRTATISIDTSKSQFSLKLSSVTAA DTAVYYCPRGPTMIRGVDSWGQGTLVTVSSGGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYY

	CQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 5 TGFbR2 scFv VL-VH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPT FGQGTKVEIKGGGGSGGGGS GGGGSQQLQVQESGPGLVKPSET LSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIR QPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNP SLKSRATISIDTSKSQFSLKLSS VTAADTAVYYCPRGPTMIRGV IDSWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 6 mTGFbR2 VH1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTTYGMGWVRQAPGK GLEWVSWIEKTGNKTTYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKARHIKVRSRDFD YWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 7	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTTYGMGWVRQAPGK GLEWVSWIEKTGNKTTYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKAGRHIKVRSRDFD YWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 8 hTGFbR2 VH1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQ GTLVTVSS
SEQ ID NO: 9 Dímero TGFbR2 VHH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQ GTLVTVSSggggsEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFG TEQMWWVRQAPGK GLEFVSRID SPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTV SS
SEQ ID NO: 10	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQ GTLVTVSSggggsggggsEVQL LES GGGLVQPGGSLRLS CAASG FTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFV SRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISR DN SKNTLYLQMNSLR

	AEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTTLVTVSS
SEQ ID NO: 11	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTTLVTVSSGGSEPKSs DKTHTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 12	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTTLVTVSSGGSEPKSs DKTHTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGgggsggsEV QLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKG LEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTTLVTVSS
SEQ ID NO: 13	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTTLVTVSSgggssggsg GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 14	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTTLVTVSSgggssggsg GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGgggsggsEVQLLES GGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVS GTFYDYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 15	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F G T E Q M W W V R Q A P G K G L E F V S R I D S P G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R R P T G V S G T F Y D Y W G Q G T L V T V S S g g g g s E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F G T E Q M W W V R Q A P G K G L E F V S R I D S P G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R R P T G V S G T F Y D Y W G Q G T L V T V S S g g g g s E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F G T E Q M W W V R Q A P G K G L E F V S R I D S P G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R R P T G V S G T F Y D Y W G Q G T L V T V S S
SEQ ID NO: 16	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F G T E Q M W W V R Q A P G K G L E F V S R I D S P G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R R P T G V S G T F Y D Y W G Q G T L V T V S S g g g g s E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F G T E Q M W W V R Q A P G K G L E F V S R I D S P G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R R P T G V S G T F Y D Y W G Q G T L V T V S S g g g g s E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F G T E Q M W W V R Q A P G K G L E F V S R I D S P G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R R P T G V S G T F Y D Y W G Q G T L V T V S S E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F G T E Q M W W V R Q A P G K G L E F V S R I D S P G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R R P T G V S G T F Y D Y W G Q G T L V T V S S g g g g s g g g g s E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F G T E Q M W W V R Q A P G K G L E F V S R I D S P G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R R P T G V S G T F Y D Y W G Q G T L V T V S S g g g g s g g g g s E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F G T E Q M W W V R Q A P G K G L E F V S R I D S P G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R R P T G V S G T F Y D Y W G Q G T L V T V S S
SEQ ID NO: 17 TGFb-scFv VH- VL1 G4S dímero	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ GLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGSG GGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQ

	QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKggggsQVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIAN YAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDNAVYYCASTLGLVL DAMDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSALETVLTQSPG TSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITF GQGTRLEIK
SEQ ID NO: 18 Dímero TGFb- scFv VH-VL1 2xG4S	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ GLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGGSG GGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKggggsggggsQVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIV DIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDNAVYYCASTL GLVLDAMDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSALETVLT QSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAD SPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 19 Minicuerpo TGFb-scFv VH- VL1 + bisagra	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ GLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGGSG GGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKGGSEPKSsDKTHTCPPCgggs sgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 20	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ

Minicuerpo TGFb-scFv VH- VL1 + dímero bisagra	GLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGSG GGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKGGSEPKSsDKTHTCPPCgggs sgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsQVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIA NYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLV LDAMDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSALETVLTQSP GTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPI TFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 21 Minicuerpo TGFb-scFv VH- VL1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ GLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGSG GGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKgggssggsgGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
SEQ ID NO: 22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ GLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGSG GGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKgggssggsgGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGggggsggsQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS

	SNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADES TSTTYMELSSLRSED TAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 23	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSSVTAA DTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPPTFGQGTKVEIKggggsQLQVQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPS LKS RATISIDTSKSQFSLKLSSVTAA DTAVYYCPRGPTMIRGVIDS WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEI K
SEQ ID NO: 24	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSSVTAA DTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPPTFGQGTKVEIKggggsggggsQLQVQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKT YYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSSVTAA DTAVYYCPRGPTMIR GVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLS LSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 25	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSSVTAA

	DTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPPTFGQGTKVEIKGGSEPKEsDKTHTCPPCgggssggg sgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 26	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRTISIDTSKSQFSLKLSSVTAA DTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPPTFGQGTKVEIKGGSEPKEsDKTHTCPPCgggssggg sgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsQLQVQESGPGLVKPSET LSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTY NPSLKSRTISIDTSKSQFSLKLSSVTAAADTAVYYCPRGPTMIRG VIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSL SPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATG IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 27	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRTISIDTSKSQFSLKLSSVTAA DTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPPTFGQGTKVEIKgggssggsgGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL SDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

SEQ ID NO: 28	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSSVTAA DTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLTVTVSSGGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPPTFGQG TKVEIKgggssggsgGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGggggsggsQLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYF SWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQ FSLKLSSVTAA DTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLTVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVR SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLT I SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQG TKVEIK
SEQ ID NO: 29 TGFbR2 VH2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGQESMYWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKSGTRIKQGF DYWGQGTLTVTVSS
SEQ ID NO: 30 TGFbR2 hVH2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTEYRMWWVRQAPG KGLEWVSAIEPIGHRTYYANSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLDYWGQGTLTVTVSS
SEQ ID NO: 31 TGFbR2 VH3	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTDQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKRQPAGVSGKYVDYWGQGTLTVTVSS
SEQ ID NO: 32 mTGFbR2ECD (I24-K31,F57- L185)	IPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVMASDNGG AVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAV WRKNDKNITLETVCHDPKLT YHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGE TFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPD L
SEQ ID NO: 33	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIP

huTGFbR1+2 ECD v1	RDRPFVCAPSSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGP VEGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRF TCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF SEEYNTSNPD [hTGFbR1-ECD(L34-E125)- hTGFbR2-ECD(A44-D151)]
SEQ ID NO: 34 huTGFbR1+2 ECD v2	QCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPR DRPFVCAPSSKTGSVTTTTYCCNQDHCNGGGGSAVKFPQLCKFC DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLET VCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECN DNIIFSE [hTGFbR1-ECD(Q35-N107)-4GS- 4GS-hTGFbR2-ECD(L34-E125)]
SEQ ID NO: 35 mTGFbR1+2 ECD v1	LQCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIP RDRPFVCAPSSKTGAVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTGPFSEKQSA GLGPVELGGGGSIIPPHVPKSVNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFC DVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLET VCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEE CNDYIIFSEEYTTSSPD [mTGFbR1-ECD(L30-L126)-4GS-mTGFbR2-ECD(I24-K31,F57- D184)]
SEQ ID NO: 36 huTGFbR1+2 ECD v2	QCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPR DRPFVCAPSSKTGAVTTTTYCCNQDHCNGGGGSAVKLPQLCKFC DVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLET VCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKE [mTGFbR1-ECD(Q31-N107)-4GS-mTGFbR2-ECD(I24-K31,F57- E150)]
SEQ ID NO: 37 Ratón TGFbR2 ECD con IgKss	METDTLLLWVLLLVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCN RTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSC MSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFT LEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSS PDL

SEQ ID NO: 38	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCN
Dímero ECD	RTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSC
TGFbR2 de	MSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFT
ratón con	LEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSS
enlazador	PDLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
8(G4S) e IgKss	GGSIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVMASD
con etiqueta de	NGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVC
bandera	VAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKR
	AGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDLGGGGG
	DYKDDDDK
SEQ ID NO: 39	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCN
Dímero TGFbR2	RTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSC
ECD	MSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFT
	LEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSS
	PDLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
	GGSIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVMASD
	NGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVC
	VAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKR
	AGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL
SEQ ID NO: 40	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIP
huTGFbR2 ECD	RDRPFVCA PSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGP
monómero1	VE
SEQ ID NO: 41	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP
Dominio de	
bisagra CD28	
SEQ ID NO: 42	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
Dominio	
transmembrana	
CD28	

SEQ ID NO: 43 Dominio bisagra/dominio CD28	IEVMYPPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLVV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
SEQ ID NO: 44 Dominio de señal CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
SEQ ID NO: 45 Dominio de señalización mutante CD3z- 1XX	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 46 Dominios transmembrana e intracelular CAR COMBINADOS	IEVMYPPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLVV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMA EAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 47 CAR anti-CCG V1-01	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG ASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMS VDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGR GTLVTVSSIEVMYPPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSK PFWWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNEL QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALH MQALPPR
SEQ ID NO: 48 CAR anti-CCG V51	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLV TVSSIEVMYPPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFW

	VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDG LFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 49 scFv anti-CD19	MGTSLLCWMALCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCK ASGYAFSSSWMNWVKQRPG KGLEWIGRIYPGDEDTNYSKGKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLT SEDSAVYFCARSLLYG DY LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSAS PGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTSYFLTINNME AE DAATYYCQQWNINPLTF GAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIFWVL WVGGVLACYSLLVTVAFI IFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY R SRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
V5 anti-GCC CAR SEQ ID NO: 50	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS GFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAV TVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO:)

V36 anti-GCC CAR SEQ ID NO: 51	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRF TISRDNANKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGT LVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO:)
CAR anti-CCG V1 SEQ ID NO: 52	MGWSCIIFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG ASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMS VDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGR GTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEG LFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO:)
CAR anti-CCG V48 SEQ ID NO: 53	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAAS GFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPD SVKGRFTVSRDNANKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGT LVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO:)
CAR anti-CCG V8 SEQ ID NO: 54	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPG KGLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSVYLQMN SLRAEDTGVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFW

	VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (
CAR anti-CCG V9 SEQ ID NO: 55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPG RGLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (
CAR anti-CCG V30 SEQ ID NO: 56	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSWVRQAPG KGREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (
CAR anti-CCG V31 SEQ ID NO: 57	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPG KGREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RADDTAVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH

	DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (
SEQ ID NO: 58 P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 59 Enlazador G4S	GGGGS
SEQ ID NO: 60 2x enlazador G4S	GGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 61	GGGGSGGGGS
CAR de CD19 de ratón SEQ ID NO: 62	METDTLLLWVLLWVPGSTGEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKA SGYAFSSYWMNWVKQRPQGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKG QATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS
	GGGGSDIELTQSPKFMSTSVG DRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVP DRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTK LEIKIEFMYPPPYLDNERSNGTIIHIKEKHLCHTQSSPKLFWALVVV AGVLFCYGLLVTVALCVIWTNSRRNRLLQSDYMNMTPRRPGLTR <u>KPYQPYAPA</u> <u>RDFAAYRPRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLE</u> KKRARDPEMGGKQQRNRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKG ERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQTLAPR
CAR de CD19 humano (con CD3-1xx) SEQ ID NO: 63	MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGY AFSSYWMNWVKQRPQGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQAT LTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWG QGTTVTVSSGGGGSGGGGS
	GGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRV SVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRF TGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIK RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKD

	KMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQA LPPR
--	---

EQUIVALENTES Y ALCANCE

[0422] Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar mediante el uso de no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita en la presente descripción. El alcance de la presente invención no pretende limitarse a la descripción anterior, sino que es tal como se expone en las siguientes reivindicaciones.

[0423] Habiendo descrito varios aspectos de al menos una modalidad de esta invención, se debe apreciar que varias alteraciones, modificaciones, y mejoras serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Dichas alteraciones, modificaciones y mejoras pretenden ser parte de esta descripción, y pretenden estar dentro del espíritu y alcance de la invención. En consecuencia, la descripción y las figuras anteriores son solo a modo de ejemplo y la invención se describe en detalle por las reivindicaciones que siguen.

[0424] El uso de términos ordinales tales como “primer,” “segundo,” “tercero,” etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de una reivindicación no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia u orden de un elemento de la reivindicación sobre otro o el orden temporal en el que se realizan actos de un método, sino que se usan simplemente como etiquetas para distinguir un elemento de una reivindicación que tiene un determinado nombre de otro elemento que tiene el mismo nombre (excepto el uso del término ordinal) a fin de distinguir entre los elementos de la reivindicación.

[0425] Debe entenderse que los artículos “un” y “uno” como se usan en la presente descripción y en las reivindicaciones incluyen los referentes plurales, a menos que se indique claramente lo contrario. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen “o” entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o de cualquier otra manera son pertinentes en un producto o proceso dado, a menos que se indique lo contrario o de cualquier otra manera sea evidente a partir del contexto. La invención incluye modalidades en las que exactamente un miembro del grupo está presente descripción, se emplea, o de cualquier otra manera es pertinente en un producto o proceso dado. La invención también

incluye modalidades en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o de cualquier otra manera son pertinentes en un producto o proceso dado. Además, debe entenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones, y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introducen en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base (o, según sea pertinente, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique de cualquier otra manera o a menos que sea evidente para un experto en la técnica que podría surgir una contradicción o incongruencia. Cuando los elementos se presentan como listas, (por ejemplo, en un grupo Markush o formato similar) debe entenderse que también se describe cada subgrupo de los elementos, y cualquier elemento o elementos pueden eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando se dice que la invención, o aspectos de la invención, comprenden elementos, características, etc. particulares, determinadas modalidades de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente, en tales elementos, características, etc. Para mantener la simplicidad, esas modalidades no se han descrito específicamente en forma detallada en todos los casos en la presente descripción. Debe entenderse además que cualquier modalidad o aspecto de la invención puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona en la descripción. Las publicaciones, sitios web y otros materiales de referencia mencionados en la presente para describir los antecedentes de la invención y proporcionar detalles adicionales con respecto a su práctica se incorporan en la presente mediante referencia.