

MOLÉCULAS DE UNIÓN A GPC3

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 63/208.274, presentada el 08 de junio de 2021, y titulada “MOLÉCULAS DE UNIÓN A GPC3”, la totalidad de la cual se incorpora en la presente descripción como referencia.

CAMPO TÉCNICO

La presente descripción se relaciona con el campo de la terapia celular y, con mayor especificidad, con anticuerpos, CAR y/o TCR que se dirigen al glipican objetivo 3 (GPC3).

ANTECEDENTES

Los cánceres humanos están por su naturaleza compuestos de células normales que han experimentado una conversión genética o epigenética para convertirse en células cancerosas anormales. Al hacerlo, las células cancerosas comienzan a expresar proteínas y otros antígenos que son distintos de los expresados por las células normales. El sistema inmunitario innato del cuerpo puede usar estos antígenos tumorales aberrantes para dirigirse específicamente a las células cancerosas y destruirlas. Sin embargo, las células cancerosas usan diversos mecanismos para evitar que las células inmunitarias, tales como los linfocitos T y B, se dirijan exitosamente a las células cancerosas.

Las terapias actuales de células T se usan en células T humanas enriquecidas o modificadas para dirigirse a y destruir células cancerosas en un paciente. Para aumentar la capacidad de las células T y las células NK para dirigirse a y destruir una célula cancerosa particular, se han desarrollado métodos para diseñar las células T para expresar constructos que dirigen las células T o células NK a una célula cancerosa diana particular. Los receptores de antígenos quiméricos (CAR, por sus

siglas en inglés) y los receptores de células T (TCR, por sus siglas en inglés) diseñadas genéticamente, que comprenden dominios de unión capaces de interactuar con un antígeno tumoral particular, permiten que las células T se dirijan y destruyan células cancerosas que expresan el antígeno tumoral particular. Existe una necesidad de CAR y TCR para dirigirse a y destruir las células cancerosas y, en particular, las células que expresan el glipican 3 (GPC3), tales como las células de carcinoma hepatocelular (HCC).

SUMARIO

Se describe un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este que comprende un dominio de unión al GPC3, en donde el dominio de unión al GPC3 comprende secuencias de tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR, por sus siglas en inglés) de la región variable de cadena pesada (HCVR, por sus siglas en inglés) de la sec. con núm. de ident.: 3, y secuencias de tres CDR de cadena ligera (LCDR) de la región variable de cadena ligera (LCVR) de la sec. con núm. de ident.: 14. En las modalidades, el dominio de unión al GPC3 que une el dominio comprende un primer dominio que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y un segundo dominio que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3), en donde (i) la HCDR1 tiene una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 5-7; (ii) la HCDR2 tiene una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 8-10; (iii) la HCDR3 tiene una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 11-13; (iv) la LCDR1 tiene una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 16-18; (v) la LCDR2 tiene una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 19-21; y (vi) la LCDR3 tiene una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 22-24; En las modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende un primer dominio que comprende tres regiones

determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) y un segundo dominio que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR), en donde: las HCDR y LCDR comprenden: (i) una HCDR1 de acuerdo con cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 5-7; una HCDR2 de acuerdo con cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 8-10; una HCDR3 de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 11-13; una LCDR1 de acuerdo con cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 16-18; una LCDR2 de acuerdo con cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 19-21; una LCDR3 de acuerdo con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 22-24. En las modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende un primer dominio variable de cadena pesada que comprende las tres HCDR y un dominio variable de cadena ligera que comprende las tres LCDR, en donde: (i) el dominio variable de cadena pesada es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 27, sec. con núm. de ident.: 33, sec. con núm. de ident.: 39, o la sec. con núm. de ident.: 45; y (ii) el dominio variable de cadena ligera es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 14, sec. con núm. de ident.: 29, sec. con núm. de ident.: 35, sec. con núm. de ident.: 41, o sec. con núm. de ident.: 47. En las modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende un primer dominio variable de cadena pesada que comprende las tres HCDR y un dominio variable de cadena ligera que comprende las tres LCDR, en donde: (i) el dominio variable de cadena pesada es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 3 y el dominio variable de cadena ligera es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 14; (ii) el dominio variable de cadena pesada es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 27 y el dominio variable de cadena ligera es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 29; (iii) el dominio variable de cadena pesada es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 33 y el dominio variable de cadena ligera es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 35; o (iv) el dominio variable de la cadena pesada es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 39 y el

dominio variable de la cadena ligera es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 41; o (v) el dominio variable de la cadena pesada es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 45 y el dominio variable de la cadena ligera es al menos 80 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 47. En las modalidades, las tres HCDR y las tres LCDR están compuestas por un polipéptido único. En las modalidades, el fragmento de unión al antígeno de este comprende un scFv. En las modalidades, el scFv comprende una secuencia de aminoácido de acuerdo con una de las sec. con núms. de ident.: 25, 31, 37, 43, o 49.

Se describe un receptor de antígeno quimérico, compuesto por un anticuerpo descrito, o un fragmento de unión al antígeno de este. En las modalidades, el receptor de antígeno quimérico comprende además un dominio transmembrana de 4-1BB/CD137, una cadena alfa de un receptor de células T, una cadena beta de un receptor de células T, 2B4, CD3 épsilon, CD4, CD5, CD8 alfa, CD9, CD16, CD19, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, NKG2D, o una cadena zeta de un receptor de células T, o cualquier combinación de estos.

Se describe un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este. Se describe un vector recombinante que comprende un ácido nucleico descrito. En las modalidades, el ácido nucleico y/o vector recombinante comprende además un ácido nucleico que codifica un receptor de TGF β negativo dominante (DN TGF β R, por sus siglas en inglés), que comprende: un dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) proveniente de un receptor de TGF β , y un dominio transmembrana (TMD, por sus siglas en inglés), en donde el polipéptido recombinante carece de residuos de aminoácidos responsables de la señalización y fosforilación presentes en un receptor de TGF β silvestre.

Se describe una célula huésped transformada con un ácido nucleico o vector recombinante descrito. En las modalidades, la célula huésped se transforma con: un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico descrito, un

anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, y un ácido nucleico que codifica un receptor de TGF β negativo dominante (DN TGF β R). En las modalidades, la célula huésped se transforma con un ácido nucleico que codifica una membrana unida a un receptor quimérico de dominio sushi de IL-15-IL-15R α . En las modalidades, la célula huésped comprende una iPSC, una célula T, o una célula NK. Se describe una composición farmacéutica que comprende una célula T y/o célula NK descritas.

Se describe un método para tratar la enfermedad en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una célula T y/o una célula NK descrita o una composición farmacéutica que comprende una célula T y/o una célula NK. En las modalidades, la enfermedad es carcinoma hepatocelular. Se describe un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto o para inmunizar un sujeto contra un carcinoma hepatocelular, el método comprende administrar una célula T y/o una célula NK descrita o una composición farmacéutica que comprende una célula T y/o una célula NK descrita. En las modalidades, la célula T y/o una célula NK es alogénica al paciente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Términos

Para que la presente descripción se entienda más fácilmente, se definen primero ciertos términos más abajo. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación.

Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un/una”, “un/una” y “el/la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera.

A menos que se indique o sea obvio específicamente por contexto, como se usa en la presente descripción, el término “o” se entiende que es inclusivo y cubre tanto “o” como “y”.

El término “y/o” donde se usa en la presente descripción va a tomarse como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes

especificados con o sin los otros. Por lo tanto, el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A y/o B” en la presente descripción pretende incluir A y B; A o B; A (sola); y B (sola). De la misma manera, el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A, B y/o C” pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (sola); B (sola); y C (sola).

El término “*p. ej.*”, como se usa en la presente descripción, se usa simplemente a manera de ejemplo, sin limitación deseada, y no deberá interpretarse como que se refiere solo a esos artículos enumerados explícitamente en la especificación.

Los términos “o más”, “al menos”, “más de/mayor que” y lo similar, *p. ej.*, “al menos un/una” se entiende que incluyen, pero no se limitan a, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 o 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o mayor que el valor indicado. También se incluye cualquier número o fracción mayor entre estos.

Por el contrario, el término “no más de/no mayor que” incluye cada valor menor que el valor indicado. Por ejemplo, “no mayor que 100 nucleótidos” incluye 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 y 0 nucleótidos. También se incluye cualquier número o fracción menor entre estos.

Los términos “pluralidad”, “al menos dos”, “dos o más”, “al menos segundo” y lo similar, se entiende que incluyen, pero no se limitan a, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 o 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o mayor. También se incluye cualquier número o fracción mayor entre estos.

A lo largo de la especificación, las palabras “que comprende”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa indicada, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas. Se entenderá que donde quiera que se describen los aspectos en la presente descripción con la expresión “que comprende”, también se proporcionan de cualquier otra manera descritas en términos de “que consiste en” y/o “que consiste esencialmente en”.

A menos que se indique o sea evidente específicamente por contexto, el término “aproximadamente” se refiere a un valor o composición que está dentro de un rango de error aceptable para el valor o composición particular como lo determina un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor o la composición, *es decir*, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” o “que está compuesto/a esencialmente de” puede significar dentro de una o más de una desviación estándar según la práctica en la técnica. “Aproximadamente” o “que está compuesto/a esencialmente de” puede significar un rango de hasta 10 % (*es decir*, $\pm 10\%$). Por lo tanto,

“aproximadamente” puede entenderse que está dentro de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % o 0,001 % mayor o menor que el valor indicado. Por ejemplo, aproximadamente 5 mg pueden incluir cualquier cantidad entre 4,5 mg y 5,5 mg. Además, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces un valor. Cuando se proporcionan valores o composiciones particulares en la presente descripción, a menos que se indique de cualquier otra manera, deberá asumirse que el significado de “aproximadamente” o “que están compuestos/as esencialmente de” está dentro de un rango de error aceptable para ese valor o composición particular.

Como se describe en la presente descripción, se entenderá que cualquier rango de concentración, rango de porcentaje, rango de relación o rango de número entero es inclusivo del valor de cualquier número entero dentro del rango mencionado y, cuando corresponda, fracciones de este (tales como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique de cualquier otra manera.

Las unidades, prefijos y símbolos usados en la presente descripción se proporcionan usando su forma aceptada por *Système International de Unites* (SI). Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. -----

A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica al que se relaciona esta descripción. Por ejemplo, Juo, “The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology”, 2nd ed., (2001), CRC Press; “The Dictionary of Cell & Molecular Biology”, 5th ed., (2013), Academic Press; y “The Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology”, Cammack *et al.* eds., 2nd ed, (2006), Oxford University Press, proporcionan los expertos en la técnica con un diccionario general para muchos de los términos usados en esta descripción.

“Administrar” se refiere a la introducción física de un agente a un sujeto, tal como una célula T modificada o una célula NK descrita en la presente descripción, usando

cualquiera de los diversos métodos y sistemas de suministro conocidos por los expertos en la técnica. Las vías de administración ilustrativas para las formulaciones descritas en la presente descripción incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La frase “administración parenteral” significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, así como electroporación *in vivo*. En algunas modalidades, la formulación se administra a través de una vía no parenteral, *p. ej.*, por vía oral. Otras vías no parenterales incluyen una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, vaginal, rectal, sublingual o tópica. La administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

Los términos “activado” y “activación” se refieren al estado de una célula T que se ha estimulado suficientemente para inducir la proliferación celular detectable. En una modalidad, la activación también puede asociarse con la producción de citocina inducida y las funciones efectoras detectables. El término “células T activadas” se refiere a, entre otras cosas, células T que proliferan. Las señales generadas a través del TCR solo pueden ser insuficientes para la activación total de la célula T y también pueden requerirse una o más señales secundarias o coestimuladoras. Por lo tanto, la activación de células T comprende una señal de estimulación primaria a través del complejo TCR/CD3 y una o más señales secundarias o coestimuladoras. La coestimulación puede evidenciarse mediante la proliferación y/o producción de citocinas por células T que han recibido una señal de activación primaria, tal como la estimulación a través del complejo TCR/CD3.

El término “agente” puede referirse a una molécula o entidad de cualquier clase que comprende, o una pluralidad de moléculas o entidades, cualquiera de las cuales puede ser, por ejemplo, un polipéptido, ácido nucleico, sacárido, lípido, molécula pequeña, metal, célula (tal como una célula T o célula NK o progenitor de tales células, por ejemplo, una iPSC), u organismo (por ejemplo, una fracción o extracto de este) o un componente de este. En algunas modalidades, un agente puede usarse de forma aislada o pura. En algunas modalidades, un agente puede usarse de forma cruda o impura. En algunas modalidades, un agente puede proporcionarse como una población, colección o biblioteca, por ejemplo, que puede analizarse para identificar o caracterizar miembros presentes en esta.

El término “alogénico/a” se refiere a cualquier material derivado de un individuo que se introduce, después, en otro individuo de la misma especie, *p. ej.*, el trasplante alogénico de células T o células NK.

El término “anticuerpo” (Ab) incluye, sin limitación, una inmunoglobulina de glicoproteína que se une específicamente a un antígeno. En general, y el anticuerpo puede comprender al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una molécula de unión al antígeno de estas. Cada cadena H comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio constante, CL. Las regiones de VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión

que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los Abs pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped, que incluyen varias células del sistema inmunitario (*p. ej.*, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. En general, los anticuerpos humanos son aproximadamente 150 kD de agentes tetaméricos compuestos de dos polipéptidos de cadena pesada (H) idénticos (aproximadamente 50 kD cada uno) y dos polipéptidos de cadena ligera (L) idénticos (aproximadamente 25 kD cada uno) que se asocian entre sí en lo que comúnmente se denomina una estructura “en forma de Y”. Las cadenas pesada y ligera se unen o conectan entre sí mediante un enlace disulfuro simple; dos otros enlaces disulfuro conectan las regiones de bisagra de cadena pesada entre sí, de manera que los dímeros se conectan entre sí y se forma el tetrámero. Los anticuerpos producidos naturalmente también se glicosilan, *p. ej.*, en el dominio CH2. El término “anticuerpo humano” pretende comprender anticuerpos que tienen secuencias de dominio variable y constante generadas, ensambladas o derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana o secuencias indistinguibles de estas. En algunas modalidades, los anticuerpos (o componentes de anticuerpos) pueden considerarse “humanos” aunque sus secuencias de aminoácidos comprendan residuos o elementos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (*p. ej.*, variaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o introducidas por mutación somática *in vivo*). El término “humanizado” pretende comprender anticuerpos que tienen un dominio variable con una secuencia derivada de un dominio variable de una especie no humana (*p. ej.*, un ratón), modificado para ser más similar a una secuencia codificada de línea germinal humana. En algunas modalidades, un anticuerpo “humanizado” comprende uno o más dominios marco que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un dominio marco humano, y una o más regiones determinantes de complementariedad que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos como la de un anticuerpo no humano. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la de un

dominio constante de inmunoglobulina humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado puede comprender un C_H1 , bisagra, C_H2 , C_H3 , y, opcionalmente, una región C_H4 de un dominio constante de cadena pesada humana. Los anticuerpos pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de manera recombinante, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (que incluyen anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos diseñados genéticamente, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, inmunoglobulinas, anticuerpos sintéticos, anticuerpos tetraméricos que comprenden moléculas de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, un monómero de cadena ligera de anticuerpo, un monómero de cadena pesada de anticuerpo, un dímero de cadena ligera de anticuerpo, un dímero de cadena pesada de anticuerpo, un par de cadena ligera de anticuerpo-cadena pesada de anticuerpo, intracuerpos, fusiones de anticuerpos (algunas veces denominadas en la presente descripción como “conjugados de anticuerpo”), anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos de dominio único, anticuerpos monovalentes, anticuerpos monocatenarios o Fvs monocatenarios (scFv), anticuerpos camellizados, cuerpos afines, fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$, Fvs unidos por disulfuro (sdFv, por sus siglas en inglés), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, *p. ej.*, anticuerpos anti-anti-Id), minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados en la presente descripción como “miméticos de anticuerpos”), y fragmentos de unión al antígeno de cualquiera de los anteriores. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente descripción se refieren a poblaciones de anticuerpos policlonales. Los anticuerpos también pueden comprender, por ejemplo, fragmentos Fab', fragmentos Fd', fragmentos Fd, CDR aisladas, Fvs monocatenarios, fusiones de polipéptido-Fc, anticuerpos de dominio único (*p. ej.*, anticuerpos de dominio único de tiburón tales como IgNAR o fragmentos de estos, y anticuerpos de cadena pesada única UniAb®), anticuerpos de camélido, diacuerpos monocatenarios o en tándem (TandAb®), Anticalins®, minicuerpos

Nanobodies®, BiTE®, proteínas de repetición de anquirina o DARPINs®, Avimers®, DART, anticuerpos similares a TCR, Adnectins®, Affilins®, Transbodies®, Affibodies®, TrimerX®, microproteínas, Fynomers®, Centyrins® y KALBITOR®.

Una inmunoglobulina puede derivarse de cualquiera de los isotipos comúnmente conocidos, que incluyen, pero no se limitan a, IgA, IgA secretora, IgG, IgE e IgM. Las subclases de IgG también son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana. “Isotipo” se refiere a la clase o subclase de Ab (*p. ej.*, IgM o IgG1) que se codifica mediante los genes de la región constante de cadena pesada. El término “anticuerpo” incluye, a manera de ejemplo, tanto Abs de origen natural como de origen no natural; Abs monoclonales y policlonales; Abs quiméricos y humanizados; Abs humanos o no humanos; Abs completamente sintéticos; y Abs monocatenarios. Un Ab no humano puede humanizarse mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre. Cuando no se indica expresamente, y a menos que el contexto indique de cualquier otra manera, el término “anticuerpo” también incluye, un fragmento de unión al antígeno o una porción de unión al antígeno de cualquiera de las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente, e incluye un fragmento o porción monovalente y divalente, y un Ab monocatenario.

Una “molécula de unión al antígeno”, “porción de unión al antígeno”, “fragmento de unión al antígeno” o “fragmento de anticuerpo” o “dominio de unión al antígeno” se refiere a cualquier molécula que comprende las partes de unión al antígeno (*p. ej.*, CDR) del anticuerpo del cual se deriva la molécula. Una molécula de unión al antígeno puede incluir las regiones determinantes de complementariedad (CDR) antigénicas. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, dAb, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos multispecíficos formados de las moléculas de unión al antígeno. Los peptidocuerpos (es decir, moléculas de fusión de Fc que comprenden dominios de unión al péptido) son otro ejemplo de moléculas de unión al antígeno adecuadas. En

algunas modalidades, la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno en una célula tumoral. En algunas modalidades, la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno en una célula involucrada en una enfermedad hiperproliferativa o a un antígeno viral o bacteriano. En ciertas modalidades, una molécula de unión al antígeno es un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T diseñadas genéticamente (TCR). En algunas modalidades, el dominio o molécula de unión al antígeno se une a glipican 3 (GPC3). En ciertas modalidades, la molécula o dominio de unión al antígeno es un fragmento de anticuerpo que se une específicamente al antígeno, que incluye una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de este. En modalidades adicionales, la molécula de unión al antígeno es un fragmento variable monocatenario (scFv). En algunas modalidades, la molécula o dominio de unión al antígeno comprende o consiste en avímeros.

En algunos casos, una CDR es sustancialmente idéntica a una que se encuentra en un anticuerpo de referencia (*p. ej.*, un anticuerpo de la presente descripción) y/o la secuencia de una CDR proporcionada en la presente descripción. En algunas modalidades, una CDR es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia (*p. ej.*, una CDR proporcionada en la presente descripción) ya que esta es idéntica en secuencia o contiene entre 1, 2, 3, 4, o 5 (*p. ej.*, 1-5) sustituciones de aminoácidos en comparación con la CDR de referencia. En algunas modalidades, una CDR es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia ya que muestra al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la CDR de referencia (*p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95-100 %). En algunas modalidades, una CDR es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia ya que muestra al menos 96 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la CDR de referencia. En algunas modalidades, una CDR es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia ya que un aminoácido se elimina, añade o sustituye dentro de la CDR en comparación con la CDR de referencia mientras la CDR tiene una secuencia

de aminoácidos que, de cualquier otra manera, es idéntica a la de la CDR de referencia. En algunas modalidades, una CDR es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia ya que 2, 3, 4 o 5 (*p. ej.*, 2-5) aminoácidos se eliminan, añaden o sustituyen dentro de la CDR en comparación con la CDR de referencia mientras la CDR tiene una secuencia de aminoácidos que, de cualquier otra manera, es idéntica a la CDR de referencia. En varias modalidades, un fragmento de unión al antígeno se une a un mismo antígeno como un anticuerpo de referencia. En varias modalidades, un fragmento de unión al antígeno compite transversalmente con el anticuerpo de referencia, por ejemplo, que se une sustancialmente al mismo o idéntico epítipo que el anticuerpo de referencia.

Un fragmento de unión al antígeno puede producirse por cualquier medio. Por ejemplo, en algunas modalidades, un fragmento de unión al antígeno puede producirse enzimática o químicamente mediante la fragmentación de un anticuerpo intacto. En algunas modalidades, un fragmento de unión al antígeno puede producirse de manera recombinante (tal como por la expresión de una secuencia de ácido nucleico diseñada genéticamente). En algunas modalidades, un fragmento de unión al antígeno puede producirse total o parcialmente y sintéticamente. En algunas modalidades, un fragmento de unión al antígeno puede tener una longitud de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 aminoácidos o más; en algunas modalidades, al menos aproximadamente 200 aminoácidos (*p. ej.*, 50-100, 50-150, 50-200 o 100-200 aminoácidos).

El término “región variable” o “dominio variable” se usa indistintamente. La región variable se refiere, típicamente, a una porción de un anticuerpo, generalmente, una porción de una cadena ligera o pesada, típicamente aproximadamente los 110 a 120 aminoácidos de amino-terminal en la cadena pesada madura y aproximadamente 90 a 115 aminoácidos en la cadena ligera madura, que difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad

en secuencia se concentra en aquellas regiones llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), mientras las regiones más altamente conservadas en el dominio variable se llaman regiones marco (FR). Sin intención de limitarse a cualquier mecanismo o teoría particular, se cree que las CDR de las cadenas ligera y pesada son principalmente responsables de la interacción y especificidad del anticuerpo con antígeno. En ciertas modalidades, la región variable es una región variable humana. En ciertas modalidades, la región variable comprende CDR de roedor o murino y regiones marco (FR) humanas. En las modalidades, la región variable es una región variable de primate (*p. ej.*, primate no humano). En ciertas modalidades, la región variable comprende CDR de roedor o murino y regiones marco (FR) de primate (*p. ej.*, primate no humano).

Los términos “VL” y “dominio VL” se usan indistintamente para referirse a la región variable de cadena ligera de un anticuerpo o una molécula de unión al antígeno de este.

Los términos “VH” y “dominio VH” se usan indistintamente para referirse a la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o una molécula de unión al antígeno de este.

Comúnmente, están en uso un número de definiciones de las CDR: numeración de Kabat, numeración Chothia, numeración de AbM o numeración de contacto. La definición de AbM es un compromiso entre los dos usados por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. La definición de contacto se basa en un análisis de las estructuras de cristal complejas disponibles.

Tabla 1. Numeración de CDR

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B (Numeración de Kabat)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
H1	H31--H35 (Numeración de Chothia)	H26--H35	H26--H32	H30--H35

H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

La expresión “numeración de Kabat” y términos similares se reconocen en la técnica y se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una molécula de unión al antígeno de este. En ciertos aspectos, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (*ver, p. ej.*, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 y Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication núm. 91-3242). Al usar el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena pesada de anticuerpo están presentes, típicamente, en las posiciones de aminoácidos 31 a 35, que opcionalmente pueden incluir uno o dos aminoácidos adicionales, después de 35 (denominados en el esquema de numeración de Kabat como 35A y 35B) (CDR1), las posiciones de aminoácidos 50 a 65 (CDR2) y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 (CDR3). Al usar el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena ligera de anticuerpo están presentes, típicamente, en las posiciones de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), las posiciones de aminoácidos 50 a 56 (CDR2) y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 (CDR3). En una modalidad específica, las CDR de los anticuerpos descritos en la presente descripción se han determinado de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat.

En ciertos aspectos, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, que se refiere a la ubicación de los bucles estructurales de inmunoglobulina (*ver, p. ej.*, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; y la patente de los EE. UU. núm. 7.709.226. Típicamente, cuando se usa la convención de numeración de Kabat, el bucle de CDR-H1 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada 26 a 32, 33, o 34, el bucle de CDR-H2 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada 52 a 56, y el bucle de

CDR-H3 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada 95 a 102, mientras el bucle de CDR-L1 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera 24 a 34, el bucle de CDR-L2 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera 50 a 56, y el bucle de CDR-L3 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera 89 a 97. El extremo del bucle de CDR-HI de Chothia, cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si no están presentes 35A ni 35B, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). En una modalidad específica, las CDR de los anticuerpos descritos en la presente descripción se han determinado de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia.

Los términos “región constante” y “dominio constante” son intercambiables y tienen un significado común en la técnica. La región constante es una porción de anticuerpo, *p. ej.*, una porción terminal de carboxilo de una cadena ligera y/o pesada que no está directamente involucrada en la unión de un anticuerpo al antígeno pero que puede presentar varias funciones efectoras, tales como la interacción con el receptor de Fc. La región constante de una molécula de inmunoglobulina generalmente tiene una secuencia de aminoácidos más conservada en relación con un dominio variable de inmunoglobulina.

El término “cadena pesada” cuando se usa en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo distinto, *p. ej.*, alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), basado en la secuencia de aminoácidos del dominio constante, que dan lugar a clases de anticuerpos de IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, que incluyen subclases de IgG, *p. ej.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

El término “cadena ligera” cuando se usa en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo distinto, *p. ej.*, kappa (κ) o lambda (λ) basado en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de

aminoácidos de cadena ligera son muy conocidas en la técnica. En modalidades específicas, la cadena ligera es una cadena ligera humana.

Un “antígeno” se refiere a un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un humano o animal, que incluye composiciones (tales como una que incluye una proteína específica tumoral) que se inyecta o absorbe en un humano o animal. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, que incluyen los inducidos por antígenos heterólogos, tales como los antígenos descritos. Un “antígeno diana” o “antígeno diana de interés” es un antígeno que no se encuentra sustancialmente en la superficie de otras células normales (deseadas) y al cual se diseña un dominio de unión de un TCR o CAR contemplado en la presente descripción para unirse. El experto en la técnica entendería fácilmente que cualquier macromolécula, lo que incluye virtualmente todas las proteínas o péptidos, puede servir como un antígeno. Un antígeno puede expresarse endógenamente, es decir, expresarse por ADN genómico, o puede expresarse de manera recombinante. Un antígeno puede ser específico para un cierto tejido, tal como una célula cancerosa, o puede expresarse ampliamente. Además, los fragmentos de moléculas más grandes pueden actuar como antígenos. En una modalidad, los antígenos son antígenos tumorales. En una modalidad particular, el antígeno es todo o un fragmento de glipican 3 (GPC3). Una “diana” es cualquier molécula unida por un dominio de unión, sistema de unión al antígeno, CAR o agente de unión al antígeno, *p. ej.*, un anticuerpo.

“Región de direccionamiento de antígenos específicos” (ASTR, por sus siglas en inglés) se refiere a la región del CAR, anticuerpo o TCR, que se dirige a antígenos específicos. Las regiones de direccionamiento en un CAR o TCR son extracelulares. En algunas modalidades, las regiones de direccionamiento de antígenos específicos comprenden un anticuerpo o un equivalente funcional de este o un fragmento de este o un derivado de este y cada una de las regiones de direccionamiento se dirige a un antígeno diferente. Las regiones de

direccionamiento pueden comprender cadena pesada de longitud completa, fragmentos Fab, fragmentos Fv de cadena única (scFv), anticuerpos o diacuerpos monocatenarios divalentes, cada uno de los cuales son específicos para el antígeno diana. Sin embargo, existen numerosas alternativas, tales como citocinas unidas (que conducen al reconocimiento de células que tienen el receptor de citocinas), cuerpos afines, dominios de unión al ligando de receptores de origen natural, ligando de proteína/péptido soluble para un receptor (por ejemplo, en una célula tumoral), péptidos, y vacunas para indicar una respuesta inmunitaria, que puede usarse, cada uno, en varias modalidades de esta descripción. De hecho, casi cualquier molécula que se une a un antígeno determinado con alta afinidad puede usarse como una región de direccionamiento de antígenos específicos, como lo apreciarán los expertos en la técnica.

“Célula presentadora de antígeno” o “APC” se refiere a células que procesan y presentan antígenos a células T. Las APC ilustrativas comprenden células dendríticas, macrófagos, células B, ciertas células epiteliales activadas y otros tipos de células capaces de estimulación de TCR y coestimulación de células T adecuadas.

Un “efecto antitumoral” se refiere a un efecto biológico que puede presentarse como una disminución en el volumen tumoral, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en la proliferación de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la supervivencia general o libre de progresión, un aumento en la expectativa de vida o mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con el tumor. Un efecto antitumoral también puede referirse a la prevención de la ocurrencia de un tumor.

Dos eventos o entidades se “asocian” entre sí si la presencia, nivel y/o forma de uno se correlaciona con el del otro. Por ejemplo, una entidad (*p. ej.*, polipéptido, firma genética, metabolito, microbio, etc.) se considera que se asocia con una enfermedad, trastorno o afección, si su presencia, nivel y/o forma se correlaciona con la incidencia de y/o susceptibilidad a la enfermedad, trastorno o afección (*p. ej.*, a través de una

población relevante). Por ejemplo, dos o más entidades están físicamente “asociadas” entre sí si interactúan, directa o indirectamente, de manera que están y/o permanecen en proximidad física entre sí (*p. ej.*, unidas). En ejemplos adicionales, dos o más entidades que se asocian físicamente entre sí se unen o conectan covalentemente entre sí, o se asocian de manera no covalente, por ejemplo por medio de enlaces de hidrógeno, interacción de van der Waals, interacciones hidrófobas, magnetismo y combinaciones de estos.

El término “autólogo” se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que se reintroduce posteriormente. Por ejemplo, el método de terapia de células autólogas diseñadas genéticamente (eACT™, por sus siglas en inglés) descrito en la presente descripción involucra la recolección de linfocitos de un paciente, que se diseñan genéticamente, después, para expresar, *p. ej.*, un constructo de CAR y se administran de regreso, después, al mismo paciente.

“Afinidad de unión” se refiere, generalmente, a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (*p. ej.*, un anticuerpo) y su colaboradora de unión (*p. ej.*, un antígeno). A menos que se indique de cualquier otra manera, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (*p. ej.*, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su colaboradora Y puede representarse, generalmente, por la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse y/o expresarse de varias maneras conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, constante de disociación (K_D , por sus siglas en inglés) de equilibrio y constante de asociación (K_A , por sus siglas en inglés) de equilibrio. La K_D se calcula del cociente de $k_{\text{apagado}}/k_{\text{encendido}}$, mientras la K_A se calcula desde el cociente de $k_{\text{encendido}}/k_{\text{apagado}}$ se refiere a la constante de velocidad de asociación de, *p. ej.*, un anticuerpo a un antígeno, y k_{apagado} se refiere a la disociación de, *p. ej.*, un anticuerpo a un antígeno. La $k_{\text{encendido}}$ y k_{apagado} pueden determinarse mediante técnicas conocidas por un experto en la técnica, tales como BIAcore® o KinExA.

El término “ K_D ” (M) se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, o la constante de equilibrio de disociación de un anticuerpo o fragmento de unión al anticuerpo que se une a un antígeno. Existe una relación inversa entre la K_D y la afinidad de unión; por lo tanto, cuanto menor es el valor de K_D , mayor, es decir, más fuerte, es la afinidad. Por lo tanto, los términos “afinidad más alta” o “afinidad más fuerte” se relacionan con una mayor capacidad para formar una interacción y, por lo tanto, un valor de K_D más pequeño y, por el contrario, los términos “afinidad más baja” o “afinidad más débil” se relacionan con una menor capacidad para formar una interacción y, por lo tanto, un valor de K_D más grande. En algunas circunstancias, una afinidad de unión más alta (o K_D) de una molécula particular (p. ej., anticuerpo) con su molécula colaboradora interactiva (p. ej., antígeno X) en comparación con la afinidad de unión de la molécula (p. ej., anticuerpo) a otra molécula colaboradora interactiva (p. ej., antígeno Y) puede expresarse como una relación de unión determinada al dividir el valor de K_D más grande (afinidad más baja o más débil) por el K_D más pequeño (afinidad más alta o más fuerte), por ejemplo, expresada como una afinidad de unión más alta 5 veces o 10 veces mayor, según sea el caso.

El término “ k_d ” (sec-1 o 1/s) se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, o la constante de velocidad de disociación de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Dicho valor también se denomina como el valor k_{off} .

El término “ k_a ” (M-1 x sec-1 o 1/M) se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, o la constante de velocidad de asociación de un anticuerpo o fragmento de unión al anticuerpo.

El término “ K_A ” (M-1 o 1/M) se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, o la constante de equilibrio de asociación de un anticuerpo o fragmento de unión al anticuerpo. La constante de equilibrio de asociación se obtiene al dividir la k_a por la K_d .

El término “unión” generalmente se refiere a una asociación no covalente entre dos o más entidades. La unión directa involucra un contacto físico entre entidades o entidades. La unión “indirecta” involucra la interacción física a manera de contacto físico con una o más entidades intermedias. La unión entre dos o más entidades puede evaluarse en cualquiera de una variedad de contextos, *p. ej.*, donde las entidades o entidades interactuantes se estudian en aislamiento o en el contexto de sistemas más complejos (*p. ej.*, mientras se asocia covalentemente o de cualquier otra manera con una entidad portadora y/o en un sistema biológico tal como una célula).

Los términos “une inmunoespecíficamente”, “reconoce específicamente”, “une específicamente” y “reconoce específicamente” son términos análogos en el contexto de anticuerpos y se refieren a moléculas que se unen a un antígeno (*p. ej.*, epítopo o complejo inmunitario) a medida que un experto en la técnica entiende tal unión. Por ejemplo, una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos, generalmente con afinidad más baja según lo determinado por, *p. ej.*, inmunoensayos, BIACORE®, instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) u otros ensayos conocidos en la técnica. En una modalidad específica, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno se unen al antígeno con una K_A que es al menos 2 registros, 2,5 registros, 3 registros, 4 registros o mayores que la K_A cuando las moléculas se unen a otro antígeno. La unión puede comprender la asociación preferencial de un dominio de unión, anticuerpo, o sistema de unión al antígeno con una diana del dominio de unión, anticuerpo o sistema de unión al antígeno en comparación con la asociación del dominio de unión, anticuerpo, o sistema de unión al antígeno con una entidad que no es la diana (es decir, no diana). En algunas modalidades, un dominio de unión, anticuerpo o sistema de unión al antígeno se une selectivamente a una diana si la unión entre el dominio de unión, anticuerpo o sistema de unión al antígeno y la diana es mayor que 2 veces, mayor que 5 veces, mayor que 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o mayor que 100 veces en comparación con la unión del

dominio de unión, anticuerpo o sistema de unión al antígeno y una no diana. En algunas modalidades, un dominio de unión, anticuerpo, o sistema de unión al antígeno se une selectivamente a una diana si la afinidad de unión es menor que aproximadamente 10^{-5} M, menor que aproximadamente 10^{-6} M, menor que aproximadamente 10^{-7} M, menor que aproximadamente 10^{-8} M, o menor que aproximadamente 10^{-9} M.

En otra modalidad, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno se une con una constante de disociación (K_d) de aproximadamente 1×10^{-7} M. En algunas modalidades, la molécula de unión al antígeno se une específicamente a un antígeno con “alta afinidad” cuando la K_d es aproximadamente 1×10^{-9} M a aproximadamente 5×10^{-9} M. En algunas modalidades, la molécula de unión al antígeno se une específicamente a un antígeno con “afinidad muy alta” cuando la K_d es 1×10^{-10} M a aproximadamente 5×10^{-10} M. En una modalidad, la molécula de unión al antígeno tiene una K_d de 10^{-9} M. En una modalidad, la tasa de disociación es menor que aproximadamente 1×10^{-5} . En las modalidades, la molécula de unión al antígeno se une a GPC3 con una K_d de aproximadamente 1×10^{-10} M a aproximadamente 5×10^{-10} M.

En ciertas modalidades, se proporciona en la presente descripción un anticuerpo o una molécula de unión al antígeno de este que se une al antígeno humano diana, p. ej., en ciertas modalidades, la molécula de unión al antígeno se une a GPC3 con un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o afinidad más alta que a otras especies del antígeno diana según lo medido por, p. ej., un radioinmunoensayo, una resonancia de plasmones superficiales, o un ensayo de exclusión cinética. En una modalidad específica, un anticuerpo o una molécula de unión al antígeno de este descrito en la presente descripción, que se une a un antígeno humano diana, se unirá a otras especies del antígeno diana con menos de 10 %, 15 %, o 20 % de la unión del anticuerpo o una molécula de unión al antígeno de este al antígeno humano según lo medido por, p. ej., un

radioinmunoensayo, una resonancia de plasmones superficiales o un ensayo de exclusión cinética. -----

“Cáncer” se refiere a un grupo amplio de varias enfermedades caracterizado por el crecimiento no controlado de células anormales en el cuerpo. La división y crecimiento celular no regulado resulta en la formación de tumores malignos que invaden tejidos vecinos y también pueden propagarse a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o torrente sanguíneo. Un “cáncer” o “tejido canceroso” puede incluir un tumor. En algunas modalidades, los métodos de la presente descripción pueden usarse para reducir el tamaño tumoral de un tumor derivado de, por ejemplo, cáncer de riñón (que incluye carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés)), cáncer de próstata, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, neoplasia intraepitelial cervical grado 3, carcinoma de células escamosas del cuello uterino, cáncer del útero adenoendocervical, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (NHL, por sus siglas en inglés), linfoma mediastinal primario de células B grandes (PMBC, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), linfoma folicular (FL, por sus siglas en inglés), linfoma folicular transformado, linfoma esplénico de la zona marginal (SMZL, por sus siglas en inglés), cáncer de esófago (adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas), cáncer de mama (tal como el carcinoma invasivo de mama, cáncer gástrico (tal como la alfa-fetoproteína que produce cáncer gástrico), liposarcoma, schwannoma, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer de pulmón (que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas escamosas), cáncer de colon,

cáncer del pene, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés) (que incluye ALL de células no T), leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), tumores sólidos en niños, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasma del sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés), linfoma del CNS primario, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos ambientalmente que incluyen los inducidos por asbestos, mesotelioma, colangiocarcinoma, otras malignidades de células B, mieloma múltiple, y combinaciones de dichos cánceres. El cáncer particular puede ser sensible a la quimio o radioterapia o el cáncer puede ser refractario. Un cáncer refractario se refiere a un cáncer que no puede subsanarse con intervención quirúrgica y el cáncer no responde inicialmente a la quimio o radioterapia o el cáncer se vuelve insensible con el tiempo.

Las “quimiocinas” son un tipo de citocina que media la quimiotaxis celular o el movimiento direccional. Los ejemplos de quimiocinas incluyen, pero no se limitan a, IL-8, IL-16, eotaxina, eotaxina-3, quimiocina derivada de macrófagos (MDC, por sus siglas en inglés o CCL22), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1, por sus siglas en inglés o CCL2), MCP-4, proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α , por sus siglas en inglés, MIP-1a), MIP-1 β (MIP-1b), proteína inducida por gamma 10 (IP-10) y quimiocina con activación regulada por el timo (TARC, por sus siglas en inglés o CCL17).

“Receptor de antígeno quimérico” o “CAR” se refiere a una molécula diseñada genéticamente para comprender un dominio de unión y un medio para activar células inmunitarias (por ejemplo, células T tales como células T naive, células T de memoria central, células T de memoria efectora, células NK o una combinación de estos) tras la unión al antígeno. Los CAR también se conocen como receptores de células T artificiales, receptores de células T quiméricos o inmunorreceptores quiméricos. En

algunas modalidades, un CAR comprende un dominio de unión, un dominio extracelular, un dominio transmembrana, uno o más dominios coestimuladores y un dominio de señalización intracelular. Una célula T que se ha diseñado genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico puede denominarse una célula CAR T. Similarmente, una célula NK que se ha diseñado genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico puede denominarse una célula CAR NK.

“Disminuir” o “bajar” o “atenuar” o “menguar”, o “reducir” se refiere generalmente a la capacidad de una composición contemplada en la presente descripción para producir, provocar o causar una menor respuesta fisiológica (es decir, un efecto cascada) en comparación con la respuesta causada por ya sea el vehículo solo (es decir, una entidad activa) o una molécula/composición de control. Una “disminución” o una cantidad “reducida” es típicamente una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir una disminución que está 1,1, 1,2, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 30 o más veces (p. ej., 500, 1000 veces) (que incluyen todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, p. ej., 1,5, 1,6, 1,7. 1,8, etc.) la respuesta (respuesta de referencia) producida por el vehículo, una composición de control.

“Dominio extracelular” (o “ECD”) se refiere a una porción de un polipéptido que, cuando el polipéptido está presente en una membrana celular, se entiende que reside fuera de la membrana celular, en el espacio extracelular.

El término “dominio de unión al ligando extracelular”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un oligo o polipéptido que es capaz de unirse a un ligando, p. ej., una molécula de superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión al ligando extracelular puede escogerse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana asociadas con un estado de la enfermedad particular (p. ej., cáncer). Los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos incluyen los asociados con infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.

El dominio de unión del CAR puede estar seguido por un “espaciador” o “bisagra”, que se refiere a la región que mueve al dominio de unión al antígeno lejos de la superficie de las células efectoras para permitir el contacto celular/con la célula adecuada, la activación y unión al antígeno (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). La región bisagra en un CAR está generalmente entre el dominio transmembrana (TM) y de unión. En ciertas modalidades, una región bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina y puede ser una región bisagra de inmunoglobulina silvestre o una región bisagra de inmunoglobulina silvestre alterada. Otras regiones de bisagra ilustrativas usadas en los CAR descritos en la presente descripción incluyen la región bisagra derivada de las regiones extracelulares de proteínas de membrana tipo 1 tales como CD8alfa, CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones de bisagra silvestre de estas moléculas o pueden alterarse.

La región o dominio “transmembrana” es la porción del CAR que ancla la porción de unión extracelular a la membrana plasmática de la célula efectora inmunitaria, y facilita la unión del dominio de unión al antígeno diana. El dominio transmembrana puede ser un dominio transmembrana de CD3zeta, sin embargo, otros dominios transmembrana que pueden usarse incluyen los obtenidos de CD8alfa, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, NKG2D, 2B4 y CD154. En ciertas modalidades, el dominio transmembrana es sintético en cuyo caso comprendería predominantemente residuos hidrófobos tales como leucina y valina.

El “dominio de señalización intracelular” o “dominio de señalización” se refiere a la parte de la proteína del receptor de antígeno quimérico que participa en la transducción del mensaje de CAR efectivo que se une a un antígeno diana en el interior de la célula efectora inmunitaria para provocar la función de célula efectora, p. ej., la activación, producción de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, que incluye la liberación de factores citotóxicos a la célula diana unida al CAR, u otras respuestas celulares provocadas con el antígeno que se une al dominio de CAR extracelular. El término “función efectora” se refiere a una función especializada de la célula. La función efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser actividad

citolítica o ayuda o actividad que incluye la secreción de una citocina. Por lo tanto, los términos “dominio de señalización intracelular” o “dominio de señalización”, usados indistintamente en la presente descripción, se refieren a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y que dirige la célula para realizar una función especializada. Si bien puede usarse, usualmente, todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos, no es necesario usar el dominio completo. En la medida en que se use una porción truncada de un dominio de señalización intracelular, tal porción truncada puede usarse en lugar del dominio completo siempre que se transduzca la señal de la función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora. El dominio de señalización intracelular también se conoce como el “dominio de transducción de señales” y se deriva típicamente de porciones de las cadenas de CD3 o FcRy humanas.

Se conoce que las señales generadas a través del receptor de células T solas son insuficientes para la activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, puede decirse que la activación de células T va a mediar mediante dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmáticas: las que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del receptor de células T (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y las que actúan de una manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias). Las secuencias de señalización citoplasmáticas que actúan de una manera coestimuladora pueden contener dominios de señalización que se conocen como dominio de activación basado en tirosina de inmunorreceptores o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que son de uso particular en la descripción incluyen los derivados de DAP10, DAP12, TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, CD3zeta, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

Como se usa en la presente descripción, el término “dominio de señalización coestimulador” o “dominio coestimulador” se refiere a la porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de superficie celular distintas de los receptores de antígeno o receptores de Fc que proporcionan una segunda señal requerida para la activación y función eficaces de linfocitos T tras la unión al antígeno. Los ejemplos de tales moléculas coestimuladoras incluyen CD27, CD28, 4-1 BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, 2B4, CD137, DAP12, B7-H2 y un ligando que se une específicamente a CD83. Por consiguiente, mientras la presente descripción proporciona dominios coestimuladores ilustrativos derivados de CD28, se contemplan otros dominios coestimuladores para usarse con los CAR descritos en la presente descripción. La inclusión de uno o más dominios de señalización coestimuladores pueden mejorar la eficacia y la expansión de células T y células NK que expresan receptores CAR. Los dominios de señalización intracelulares y de señalización coestimuladores pueden unirse en cualquier orden en tándem al carboxilo terminal del dominio transmembrana.

Aunque se ha mostrado que los CAR basados en scFv diseñados genéticamente para contener un dominio de señalización de CD3 o FcRgamma suministran una señal potente para la activación y función efectora de células T, ellos no son suficientes para provocar señales que promueven la supervivencia y expansión de las células T en ausencia de una señal coestimuladora concomitante. Otros CAR que contienen un dominio de unión, una bisagra, una transmembrana y el dominio de señalización derivado de CD3zeta o FcRgamma junto con uno o más dominios de señalización coestimuladores (p. ej., dominios coestimuladores intracelulares derivados de 4-1BB, CD28, CD134 y CD278) puede dirigir más efectivamente la actividad antitumoral así como una mayor secreción de citocinas, actividad lítica, supervivencia y proliferación en células T que expresan CAR in vitro, y en modelos animales y pacientes con cáncer (Milone et al., *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong et al., *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito et al., *PNAS*, 2009; 106:3360-3365).

Una “señal coestimuladora” se refiere a una señal, la cual en combinación con una señal primaria, tal como la ligación TCR/CD3, lleva a la respuesta de células T, tal como, pero sin limitarse a, la proliferación y/o regulación en ascenso o regulación en descenso de moléculas clave.

Un “ligando coestimulador” incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno que se une específicamente a una molécula coestimuladora cognada en una célula T. La unión del ligando coestimulador proporciona una señal que media una respuesta de células T, que incluye, pero no se limita a, proliferación, activación, diferenciación y lo similar. Un ligando coestimulador induce una señal que se proporciona además de la señal primaria proporcionada por una molécula estimuladora, por ejemplo, al unir un complejo de receptor de células T (TCR)/CD3 con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) cargada con el péptido. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitarse a, 3/TR6, ligando 4-1BB, agonista o anticuerpo que se une al receptor toll del ligando, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), ligando de CD30, CD40, CD7, CD70, CD83, mediador de entrada de herpes virus (HVEM, por sus siglas en inglés), antígeno leucocitario humano G (HLA-G, por sus siglas en inglés), ILT4, transcripción similar a inmunoglobulina (ILT, por sus siglas en inglés) 3, ligando coestimulador inducible (ICOS-L, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión intercelular (ICAM, por sus siglas en inglés), ligando que se une específicamente con B7-H3, receptor beta de linfotóxina, cadena de clase I del MHC relacionada con proteína A (MICA), cadena de clase I del MHC relacionada con proteína B (MICB), ligando OX40, PD-L2, o muerte programada (PD) L1. Un ligando coestimulador incluye, sin limitación, un anticuerpo que se une específicamente a una molécula coestimuladora presente en una célula T, tal como, pero no se limita a, 4-1BB, B7-H3, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD7, ICOS, ligando que se une específicamente con CD83, antígeno-1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1, por sus siglas en inglés), receptor C de células destructoras naturales (NKG2C), OX40, PD-1 o miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF14, por sus siglas en inglés o

LIGHT). Un ligando coestimulador también puede unirse a una molécula coestimuladora cognada en una célula NK.

Una “molécula coestimuladora” es una colaboradora de unión cognada en una célula T (y en algunos casos una célula NK) que se une específicamente a un ligando coestimulador, que media de esta manera una respuesta coestimuladora por la célula T, tal como, pero no se limita a, una proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, Una “molécula coestimuladora” se refiere a la colaboradora de unión cognada en una célula T que se une específicamente a un ligando coestimulador, que media, de esta manera, una respuesta coestimuladora por la célula T, tal como, pero no se limita a, una proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, 4-1BB/CD137, B7-H3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD 33, CD 45, CD100 (SEMA4D), CD103, CD134, CD137, CD154, CD16, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD22, CD247, CD27, CD276 (B7-H3), CD28, CD29, CD3 (alfa; beta; delta; épsilon; gamma; zeta), CD30, CD37, CD4, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD5, CD64, CD69, CD7, CD80, ligando de CD83, CD84, CD86, CD8alfa, CD8beta, CD9, CD96 (táctil), CDI-Ia, CDI-Ib, CDI-Ic, CDI-Id, CDS, CEACAM1, CRT AM, DAP-10, DNAM1 (CD226), receptor de Fc gamma, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, ICOS, Ig alfa (CD79a), IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, integrina, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGBI, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, LIGHT, LIGHT (miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral; TNFSF14), LTBR, Ly9 (CD229), antígeno asociado a la función linfocitaria 1 (LFA-1 (CDI Ia/CD18), molécula de clase I del MHC, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX40, PAG/Cbp, PD-1, PSGL1, SELPLG (CD162), molécula de activación linfocítica de señalización, SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Lyl08), SLAMF7, SLP-76, TNF, TNFr, TNFR2, receptor toll del ligando, TRANCE/RANKL, VLA1, o VLA-6, o fragmentos, truncamientos, o combinaciones de estos.

Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es una 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 se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*p. ej.*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*p. ej.*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (*p. ej.*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (*p. ej.*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (*p. ej.*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*p. ej.*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). En ciertas modalidades, uno o más residuos de aminoácidos dentro de una CDR(s) o dentro de una región(es) marco de un anticuerpo o molécula de unión al antígeno de este pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido con una cadena lateral similar. En general, se considera que dos secuencias son generalmente “sustancialmente similares” si contienen una sustitución conservadora de aminoácidos en las posiciones correspondientes. Por ejemplo, ciertos aminoácidos se clasifican generalmente como aminoácidos “hidrófobos” o “hidrófilos” y/o como que tiene cadenas laterales “polares” o “no polares”. La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo puede considerarse una sustitución conservadora. Las categorizaciones de aminoácidos ilustrativas se resumen en las Tablas 2 y 3 más abajo:

Tabla 2

Aminoácido	3 letra	1 letra	Propiedad	Propiedad	Índice de hidropatía
Alanina	Ala	A	No polares	Neutro	1,8
Arginina	Arg	R	Polar	Positivo	-4,5
Asparagina	Asn	N	Polar	Neutro	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	Polar	Negativo	-3,5
Cisteína	Cis	C	No polares	Neutro	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	Polar	Negativo	-3,5
Glutamina	Gln	Q	Polar	Neutro	-3,5
Glicina	Gli	G	No polares	Neutro	-0,4
Histidina	His	H	Polar	Positivo	-3,2

Isoleucina	Ile	I	No polares	Neutro	4,5
Leucina	Leu	L	No polares	Neutro	3,8
Lisina	Lis	K	Polar	Positivo	-3,9
Metionina	Met	M	No polares	Neutro	1,9
Fenilalanina	Phe	F	No polares	Neutro	2,8
Prolina	Pro	P	No polares	Neutro	-1,6
Serina	Ser	S	Polar	Neutro	-0,8
Treonina	Tr	T	Polar	Neutro	-0,7
Triptófano	Trp	W	No polares	Neutro	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	Polar	Neutro	-1,3
Valina	Val	V	No polares	Neutro	4,2

Tabla 3

Aminoácidos ambiguos	3 letras	1 letra
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

“Terapia combinada” se refiere a aquellas situaciones en las que un sujeto se expone simultáneamente a dos o más regímenes terapéuticos (*p. ej.*, dos o más entidades terapéuticas). En algunas modalidades, los dos o más regímenes pueden administrarse simultáneamente; en algunas modalidades, tales regímenes pueden administrarse secuencialmente (*p. ej.*, todas las “dosis” de un primer régimen se administran antes de la administración de cualquier dosis de un segundo régimen); en algunas modalidades, tales agentes se administran en regímenes de dosificación superpuestos. En algunas modalidades, la “administración” de la terapia combinada puede involucrar la administración de uno o más agente(s) o modalidad(es) a un sujeto que recibe el(los) otro(s) agente(s) o modalidad(es) en la combinación. Para claridad, la terapia combinada no requiere que los agentes individuales se administren juntos en una sola composición (o incluso necesariamente al mismo tiempo), aunque en algunas modalidades, dos o más agentes, o entidades activas de estos, pueden administrarse juntos en una composición combinada, o incluso en un compuesto combinado (*p. ej.*, como parte de un único complejo químico o entidad covalente).

“Correspondiente a” puede usarse para designar la posición/identidad de un elemento estructural en una molécula o composición a través de la comparación con una molécula o composición de referencia adecuada. Por ejemplo, en algunas modalidades, un residuo monomérico en un polímero (*p. ej.*, un residuo de aminoácido en un polipéptido o un residuo de ácido nucleico en un polinucleótido) puede identificarse como “correspondiente a” un residuo en un polímero de referencia adecuado. Por ejemplo, para propósitos de simplicidad, los residuos en un polipéptido pueden designarse usando un sistema de numeración canónico basado en un polipéptido relacionado de referencia, de manera que un aminoácido “correspondiente a” un residuo en la posición 100, por ejemplo, no necesita ser realmente el 100avo aminoácido en una cadena de aminoácidos siempre que corresponda al residuo encontrado en la posición 100 en el polipéptido de referencia. Se encuentran disponibles varias estrategias de alineación de secuencias, que comprenden programas informáticos tales como, por ejemplo, BLAST, CS-BLAST, CUDASW++, DIAMOND, FASTA, GGSEARCH/GLSEARCH, Genoogle, HMMER, HHpred/HHsearch, IDF, Infernal, KLAST, USEARCH, parasail, PSI-BLAST, búsqueda de PSI, ScalaBLAST, Sequilab, SAM, SSEARCH, SWAPHI, SWAPHI-LS, SWIMM, o SWIPE que puede usarse, por ejemplo, para identificar residuos “correspondientes” en polipéptidos y/o ácidos nucleicos de acuerdo con la presente descripción.

Una molécula de unión al antígeno, tal como un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de este, CAR o TCR, “compite transversalmente” con una molécula de unión de referencia, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este, si la interacción entre un antígeno y la primera molécula de unión al antígeno bloquea, limita, inhibe, o reduce, de cualquier otra manera, la capacidad de la molécula de unión de referencia para interactuar con el antígeno. Puede completarse la competencia transversal, *p. ej.*, la unión de la molécula de unión al antígeno bloquea completamente la capacidad de la molécula de unión de referencia para unir el antígeno, o puede ser parcial, *p. ej.*, la unión de la molécula de unión al antígeno al antígeno reduce la

capacidad de la molécula de unión al antígeno de referencia para unir el antígeno. En ciertas modalidades, una molécula de unión al antígeno que compite transversalmente con una molécula de unión al antígeno de referencia se une al mismo o un epítopo superpuesto que la molécula de unión al antígeno de referencia. En otras modalidades, la molécula de unión al antígeno que compite transversalmente con una molécula de unión al antígeno de referencia se une a un epítopo diferente que la molécula de unión al antígeno de referencia. Pueden usarse numerosos tipos de ensayos de unión competitiva para determinar si una molécula de unión al antígeno compite con otra, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) directo o indirecto en fase sólida; inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés) directo o indirecto en fase sólida; un ensayo de competencia tipo sándwich (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619); ensayo etiquetado directo en fase sólida, ensayo tipo sándwich etiquetado directo en fase sólida (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA etiquetado directo en fase sólida usando una etiqueta 1-125 (Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); y RIA etiquetado directo (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82).

Una “citocina” se refiere a una proteína no anticuerpo que se libera mediante una célula en respuesta al contacto con un antígeno específico, en donde la citocina interactúa con una segunda célula para mediar una respuesta en la segunda célula. Una citocina puede expresarse endógenamente mediante una célula o administrarse a un sujeto. Las citocinas pueden liberarse mediante las células inmunitarias, que incluyen macrófagos, células B, células T y mastocitos para propagar una respuesta inmunitaria. Las citocinas pueden inducir varias respuestas en la célula receptora. Las citocinas pueden incluir citocinas homeostáticas, quimiocinas, citocinas proinflamatorias, efectores y proteínas de fase aguda. Por ejemplo, las citocinas homeostáticas, que incluyen interleucina (IL) 7 e IL-15, promueven la supervivencia y proliferación de células inmunitarias,

y las citocinas proinflamatorias pueden promover una respuesta inflamatoria. Los ejemplos de citocinas homeostáticas incluyen, pero no se limitan a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15 e interferón (IFN) gamma. Los ejemplos de citocinas proinflamatorias incluyen, pero no se limitan a, IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-13, IL-17a, factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, TNF-beta, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) 2, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión intercelular soluble 1 (sICAM-1, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión vascular soluble 1 (sVCAM-1, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), VEGF-C, VEGF-D y factor de crecimiento placentario (PLGF, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de efectores incluyen, pero no se limitan a, granzima A, granzima B, ligando Fas soluble (sFasL, por sus siglas en inglés) y perforina. Los ejemplos de proteínas de fase aguda incluyen, pero no se limitan a, proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés) y amiloide A sérica (SAA, por sus siglas en inglés).

El término “dominio” se refiere a una porción de una entidad. En algunas modalidades, un “dominio” se asocia con una característica estructural y/o funcional de la entidad, *p. ej.*, de manera que, cuando el dominio se separa físicamente del resto de su entidad original, conserva sustancialmente o completamente la característica estructural y/o funcional. En algunas modalidades, un dominio puede comprender una porción de una entidad que, cuando se separa de esa entidad (original) y se une o conecta con una entidad (receptora) diferente, conserva y/o imparte sustancialmente en la entidad receptora una o más características estructurales y/o funcionales, *p. ej.*, que se caracteriza en la entidad original. En algunas modalidades, un dominio es una porción de una molécula (*p. ej.*, una molécula pequeña, carbohidrato, lípido, ácido nucleico o polipéptido). En algunas modalidades, un dominio es una sección de un polipéptido; en algunas de tales modalidades, un dominio se caracteriza por un elemento estructural (*p. ej.*, una secuencia de aminoácidos o dominio de secuencia, carácter de hélice α ,

carácter de lámina β , carácter de bobina en espiral, carácter de bobina aleatorio, etc.), y/o por una característica funcional (*p. ej.*, actividad de unión, actividad enzimática, actividad de plegado, actividad de señalización, etc.).

El término “forma de dosificación” puede usarse para referirse a una unidad discreta físicamente de un agente activo (*p. ej.*, un sistema o anticuerpo de unión al antígeno) para administración a un sujeto. Generalmente, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de agente activo. En algunas modalidades, tal cantidad es una cantidad de dosis unitaria (o una fracción completa de esta) adecuada para administración de acuerdo con un régimen de dosificación que se ha determinado para correlacionarse con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante. La cantidad total de una composición o agente terapéutico administrado a un sujeto se determina por uno o más profesionales médicos y puede involucrar la administración de más de una forma de dosificación.

El término “régimen de dosificación” puede usarse para referirse a un conjunto de una o más dosis unitarias que se administran individualmente a un sujeto. En algunas modalidades, un agente terapéutico determinado tiene un régimen de dosificación recomendado, que puede involucrar una o más dosis. En algunas modalidades, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis cada una de las cuales se separa con en el tiempo de otras dosis. En algunas modalidades, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis y las dosis consecutivas se separan entre sí por periodos de tiempo de igual longitud; en algunas modalidades, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis y las dosis consecutivas se separan entre sí por periodos de tiempo de al menos dos longitudes diferentes. En algunas modalidades, todas las dosis dentro de un régimen de dosificación son de la misma cantidad de dosis unitaria. En algunas modalidades, las dosis diferentes dentro de un régimen de dosificación son de cantidades diferentes. En algunas modalidades, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una segunda

cantidad de dosis diferente de la primera cantidad de dosis. En algunas modalidades, se ajusta periódicamente un régimen de dosificación para lograr un resultado deseado o beneficioso.

“Célula efectora” se refiere a una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc y media una o más funciones efectoras. En algunas modalidades, las células efectoras pueden comprender, sin limitación, uno o más de monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células destructoras naturales (NK), linfocitos T y linfocitos B. Las células efectoras pueden ser de cualquier organismo que comprende, sin limitación, humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

“Función efectora” se refiere a un resultado biológico de la interacción de una región Fc del anticuerpo con un receptor Fc o ligando. Las funciones efectoras comprenden, sin limitación, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés), y citotoxicidad mediada por complemento (CMC, por sus siglas en inglés). Una función efectora puede ser dependiente de la unión al antígeno, independiente de la unión al antígeno, o ambos. La ADCC se refiere a la lisis de células diana unidas al anticuerpo mediante células efectoras inmunitarias. Sin intención de limitarse a cualquier teoría, la ADCC se entiende generalmente que involucra células efectoras que tienen el receptor Fc (FcR) que reconocen y posteriormente destruyen las células diana revestidas con anticuerpos (*p. ej.*, células que se expresan en sus antígenos de superficie a los que se une un anticuerpo). Las células efectoras que median la ADCC pueden comprender células inmunitarias, que comprenden, pero sin limitarse a, una o más de células destructoras naturales (NK), macrófagos, neutrófilos, eosinófilos.---

El término “terapia de células autólogas diseñadas genéticamente”, que puede abreviarse como “eACT™”, también conocido como transferencia de células adoptivas, es un proceso mediante el cual se recolectan las células propias de un

paciente, tal como las células T y, posteriormente, se alteran genéticamente para reconocer y dirigir uno o más antígenos expresados en la superficie celular de una o más células tumorales específicas o malignidades. Las células inmunitarias pueden diseñarse genéticamente para expresar, por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos (CAR) o receptor de células T (TCR). Las células inmunitarias CAR positivas (+) pueden diseñarse genéticamente para expresar un fragmento variable monocatenario (scFv) extracelular con especificidad para un antígeno tumoral particular unido a una parte de señalización intracelular que comprende al menos un dominio coestimulador y al menos un dominio de activación. El dominio coestimulador puede derivarse de un dominio coestimulador de origen natural, o una variante de este, *p. ej.*, una variante que tiene un dominio bisagra truncado (“THD”, por sus siglas en inglés), y el dominio de activación puede derivarse de, *p. ej.*, CD3-zeta. En ciertas modalidades, el CAR se diseña para tener dos, tres, cuatro o más dominios coestimuladores. El scFv de CAR puede diseñarse para dirigirse, por ejemplo, a GPC3, que son proteínas transmembrana expresadas en varias células cancerosas.

En algunas modalidades, el CAR se diseña genéticamente de tal manera que el dominio coestimulador se expresa como una cadena de polipéptido separada. Los constructos y terapias de células CAR T ilustrativas se describen en la publicación de las patentes de los EE. UU. núms. 2013/0287748, 2014/0227237, 2014/0099309 y 2014/0050708, que se incorporan como referencia en su totalidad. La “terapia de células adoptivas” o “ACT” involucra la transferencia de células inmunitarias con actividad antitumoral en un sujeto, *p. ej.*, un paciente con cáncer. En algunas modalidades, ACT es un enfoque de tratamiento que involucra el uso de linfocitos (*p. ej.*, linfocitos diseñados genéticamente) con actividad antitumoral. -----

Un “epítopo” se refiere a una región localizada de un antígeno al que puede unirse específicamente un anticuerpo. Un epítopo puede ser, por ejemplo, aminoácidos contiguos de un polipéptido (epítopo lineal o contiguo) o un epítopo, por ejemplo, pueden reunirse de dos o más regiones no contiguas de un polipéptido o

polipéptidos (epítipo conformacional, no lineal, discontinuo o no contiguo). En ciertas modalidades, el epítipo al que se une un anticuerpo puede determinarse mediante, *p. ej.*, espectroscopía de NMR, estudios de cristalografía de difracción de rayos X, ensayos ELISA, intercambio de hidrógeno/deuterio acoplado con espectrometría de masas (*p. ej.*, espectrometría de masas por electroaspersión de cromatografía líquida), ensayos de exploración de oligo-péptidos basados en matrices y/o mapeo de mutagénesis (*p. ej.*, mapeo de mutagénesis dirigido al sitio). Para la cristalografía de rayos X, la cristalización puede lograrse usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (*p. ej.*, Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPerson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPerson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Los anticuerpos: cristales de antígeno pueden estudiarse usando técnicas de difracción de rayos X muy conocidas y pueden refinarse usando un software informático tal como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuidos por Molecular Simulations, Inc.; ver, *p. ej.*, *Meth Enzymol* (1985) volúmenes 114 y 115, eds Wyckoff HW *et al.*; patente de los EE. UU. núm. 2004/0014194), y BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Los estudios de mapeo de mutagénesis pueden lograrse usando cualquier método conocido por un experto en la técnica. Ver, *p. ej.*, Champe M *et al.*, (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 y Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 para una descripción de técnicas de mutagénesis, que incluyen técnicas de mutagénesis de exploración de alanina.

“Endógeno”, con referencia a un gen, proteína y/o ácido nucleico se refiere a la presencia natural de ese gen, proteína y/o ácido nucleico en una célula, tal como una célula inmunitaria.

“Exógeno” se refiere a un agente introducido, tal como un ácido nucleico, gen o proteína, en una célula, por ejemplo, desde una fuente externa. Un ácido nucleico

introducido en una célula es exógeno incluso si codifica una proteína que se encuentra naturalmente en la célula. Tal introducción exógena de un ácido nucleico que codifica una proteína puede usarse para aumentar la expresión de la proteína sobre el nivel que se encontraría naturalmente en la célula bajo condiciones similares, p. ej., sin la introducción del ácido nucleico exógeno.

El término “excipiente” se refiere a un agente que puede estar comprendido en una composición, por ejemplo, para proporcionar o contribuir a una consistencia o efecto estabilizador deseado. En algunas modalidades, un excipiente adecuado puede comprender, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol o lo similar.

Un “fragmento” o “porción” de un material o entidad como se describe en la presente descripción tiene una estructura que comprende una porción discreta de la totalidad, *p. ej.*, de una entidad física o entidad abstracta. En algunas modalidades, un fragmento carece de una o más entidades que se encuentran en su totalidad. En algunas modalidades, un fragmento consiste en o comprende un elemento, dominio o entidad estructural característico/a que se encuentra en su totalidad. En algunas modalidades, un fragmento de polímero comprende o consiste en al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 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, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más unidades monoméricas (*p. ej.*, residuos) como se encuentra en todo el polímero. En algunas modalidades, un fragmento de polímero comprende o consiste en al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de las unidades monoméricas (*p. ej.*, residuos) que se encuentran en todo el polímero (*p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-

100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %). Todo el material o la entidad puede, en algunas modalidades, denominarse como el “original” del fragmento.

El término “polipéptido de fusión” o “proteína de fusión” generalmente se refiere a un polipéptido que comprende al menos dos segmentos. Generalmente, un polipéptido que contiene al menos dos de tales segmentos se considera un polipéptido de fusión si los dos segmentos son entidades que (1) no están comprendidas en naturaleza en el mismo péptido, y/o (2) no se han unido o conectado anteriormente entre sí en un solo polipéptido, y/o (3) se han unido o conectado entre sí por medio de la acción de la mano del hombre. En las modalidades, un CAR es una proteína de fusión. En las modalidades, un TCR es una proteína de fusión. En las modalidades, un receptor negativo dominante de TGFbeta es una proteína de fusión.

El término “producto génico” o “producto de expresión” generalmente se refiere a un ARN transcrito desde el gen (pre y/o posprocesamiento) o un polipéptido (pre y/o posmodificación) codificado por un ARN transcrito desde el gen.

El término “diseñado genéticamente” o “diseñado genéticamente” se refiere a un método para modificar el genoma de una célula, que incluye, pero no se limita a, eliminar una región de codificación o no codificación o una porción de esta o insertar una región de codificación o una porción de esta. En algunas modalidades, la célula que se modifica es un linfocito, *p. ej.*, una célula T o célula NK, que puede obtenerse de un paciente o un donante. En algunas modalidades, la célula que se modifica es una célula madre pluripotente inducida (iPSC, por sus siglas en inglés) que puede diferenciarse con un linfocito, tal como una célula T o célula NK. La célula puede modificarse para expresar un constructo exógeno, tal como *p. ej.*, un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR), que se incorpora en el genoma de la célula. También pueden hacerse otras ediciones génicas, por ejemplo, para reducir el rechazo y/o mejorar la aptitud celular. Generalmente, diseñar genéticamente comprende la manipulación mediante la mano del hombre. Por ejemplo, se considera que un polinucleótido es “diseñado genéticamente” cuando dos

o más secuencias, que no se unen o conectan entre sí en ese orden en la naturaleza, se manipulan mediante la mano del hombre para unirse o conectarse directamente entre sí en el polinucleótido diseñado genéticamente. En el contexto de la manipulación de células mediante técnicas de biología molecular, se considera que una célula u organismo se “diseña genéticamente” si se ha manipulado de manera que se altera su información genética (*p. ej.*, el nuevo material genético no presente anteriormente se ha introducido, por ejemplo, mediante transformación, hibridación somática, transfección, transducción u otro mecanismo, o se altera o retira el material genético presente anteriormente, por ejemplo, mediante mutación por sustitución o eliminación, o mediante otros protocolos). En algunas modalidades, un agente de unión es un linfocito modificado, *p. ej.*, una célula T o célula NK, que puede obtenerse de un paciente o un donante. Una célula diseñada genéticamente puede modificarse para expresar un constructo exógeno, tal como *p. ej.*, un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR), que se incorpora en el genoma de la célula. La progenie de un polinucleótido o agente de unión diseñado genéticamente se denomina, generalmente, “diseñado genéticamente” aunque la manipulación real se realizó en una entidad anterior. En algunas modalidades, “diseñada genéticamente” se refiere a una entidad que se ha diseñado y producido. El término “diseñado” se refiere a un agente (i) cuya estructura se selecciona o seleccionó mediante la mano del hombre; (ii) que se produce mediante un proceso que requiere la mano de mano; y/o (iii) que es distinto de sustancias naturales y otros agentes conocidos.

Un “receptor de células T” o “TCR” se refiere a las moléculas de reconocimiento de antígeno presentes en la superficie de células T. Durante el desarrollo normal de células T, cada uno de los cuatro genes de TCR, α , β , γ y δ , puede reorganizarse lo que conduce a proteínas TCR altamente diversas.

El término “heterólogo” significa de cualquier fuente distinta de las secuencias de origen natural. Por ejemplo, una secuencia heteróloga incluida como una parte de una proteína coestimuladora es de aminoácidos que no son de origen natural como,

es decir, no se alinean con, la proteína coestimuladora humana silvestre. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos heteróloga se refiere a una secuencia de nucleótidos distinta a la de la secuencia de codificación de la proteína coestimuladora humana silvestre.

El término “identidad” se refiere al parentesco general entre moléculas poliméricas, *p. ej.*, entre moléculas de ácido nucleico (*p. ej.*, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. Se conocen métodos para el cálculo de un porcentaje de identidad entre dos secuencias de polipéptidos proporcionadas. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido, por ejemplo, puede realizarse al alinear las dos secuencias para propósitos de comparación óptimos (*p. ej.*, pueden introducirse espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencias para una alineación óptima y pueden ignorarse secuencias no idénticas para propósitos de comparación). Después, se comparan los nucleótidos o aminoácidos en las posiciones correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo residuo (*p. ej.*, nucleótido o aminoácido) como la posición correspondiente en la segunda secuencia, después, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, que consideran, opcionalmente, el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que puede necesitar introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación o alineación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático, tal como BLAST (herramienta básica de búsqueda de alineación local). En algunas modalidades, las moléculas poliméricas se consideran que son “homólogas” entre sí si sus secuencias son al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idénticas (*p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %).

Para calcular el porcentaje de identidad, las secuencias que se comparan se alinean, típicamente, de una manera que da la máxima coincidencia entre las secuencias. Un ejemplo de un programa informático que puede usarse para determinar el porcentaje de identidad es el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.). El algoritmo informático GAP se usa para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los cuales va a determinarse el porcentaje de identidad de secuencia. Las secuencias se alinean para lograr una coincidencia óptima de su aminoácido o nucleótido respectivo (el “tramo coincidente”, según lo determinado por el algoritmo). En ciertas modalidades, una matriz de comparación estándar (ver, Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 for the PAM 250 comparison matrix; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 for the BLOSUM 62 comparison matrix) también se usa mediante el algoritmo. También están disponibles otros algoritmos para la comparación de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, que comprenden los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST espaciado y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Tales programas ilustrativos se describen en Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs,” Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias similares, los programas mencionados anteriormente proporcionan, generalmente, una indicación del grado de similitud. En algunas modalidades, se considera que dos secuencias son sustancialmente similares si al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al

menos 80 %, al menos 85 %, 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 % o más de sus residuos correspondientes son similares y/o idénticos sobre un estiramiento relevante de residuos (p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %). En algunas modalidades, el estiramiento relevante es una secuencia completa. En algunas modalidades, el estiramiento relevante es al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 225, al menos 250, al menos 275, al menos 300, al menos 325, al menos 350, al menos 375, al menos 400, al menos 425, al menos 450, al menos 475, al menos 500 o más residuos. Las secuencias con una similitud de secuencia sustancial pueden ser homólogos entre sí.

El término “identidad sustancial” o “sustancialmente idéntica”, cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento de este, indica que, cuando se alinea óptimamente con las inserciones o eliminaciones de nucleótidos adecuadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 95 % y, con mayor preferencia al menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases de nucleótidos, según lo medido por cualquier algoritmo muy conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se describe más abajo. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos igual o sustancialmente similar que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Como se aplica a los polipéptidos, el término “similitud sustancial” o “sustancialmente similar” significa que dos secuencias de péptidos, cuando se

alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de espacio por defecto, comparten al menos 95 % de identidad de secuencia, incluso con mayor preferencia, al menos 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Los términos “mejorar”, “aumentar”, “inhibir” y “reducir” indican valores que están en relación con un valor de referencia u otra medición de referencia. En algunas modalidades, una medición de referencia adecuada puede comprender una medición en cierto sistema (*p. ej.*, en un solo individuo) bajo presencia ausente de condiciones, de cualquier otra manera, comparables de (*p. ej.*, antes y/o después) un agente o tratamiento, o en presencia de un agente de referencia comparable adecuado. En algunas modalidades, una medición de referencia adecuada puede comprender una medición en un sistema comparable conocido o que se espera que responda, de manera comparable, en presencia del agente o tratamiento relevante. Una “respuesta inmunitaria” se refiere a la acción de una célula del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, células destructoras naturales (NK), macrófagos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas y neutrófilos) y macromoléculas solubles producidas por cualquiera de estas células o el hígado (que incluyen Abs, citocinas y complemento) que resulta en un direccionamiento selectivo, unión a, daño a, destrucción de y/o eliminación de un cuerpo de vertebrados de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas u otras células anormales, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

El término “inmunoterapia” se refiere al tratamiento de un sujeto afectado por, o en riesgo de contraer o padecer una recurrencia de, una enfermedad mediante un método que comprende inducir, mejorar, suprimir o modificar, de cualquier otra manera, una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de inmunoterapia incluyen, pero no se limitan a, terapias de células NK y células T. La terapia de células T puede incluir la terapia de células T adoptivas, inmunoterapia de linfocitos infiltrantes de

tumores (TIL, por sus siglas en inglés), terapia de células autólogas, terapia de células autólogas diseñadas genéticamente (eACT™) y trasplante de células T alogénicas. Sin embargo, un experto en la técnica reconocería que los métodos acondicionadores descritos en la presente descripción mejorarían la eficacia de cualquier terapia de células T trasplantadas. Los ejemplos de terapias de células T se describen en la publicación de las patentes de los EE. UU. núms. 2014/0154228 y 2002/0006409, la patente de los EE. UU. núm. 5,728,388 y la publicación internacional núm. WO 2008/081035.

Las células T o células NK de la inmunoterapia pueden provenir de cualquier fuente conocida en la técnica. Por ejemplo, las células T y las células NK pueden diferenciarse *in vitro* de una población de células madre hematopoyéticas (por ejemplo, iPSC) o pueden obtenerse de un sujeto. Las células T y las células NK pueden obtenerse de, *p. ej.*, células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), médula ósea, tejido de ganglio linfático, sangre de cordón, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. Además, las células T pueden derivarse de una o más líneas de células T disponibles en la técnica. Las células T también pueden obtenerse de una unidad de sangre recolectada de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por el experto, tales como la separación por FICOLL™ y/o aféresis. Los métodos adicionales para aislar células T para una terapia de células T se describen en la publicación de la patente de los EE. UU. núm. 2013/0287748, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

El término “*in vitro*” se refiere a eventos que ocurren en un ambiente artificial, *p. ej.*, en un tubo de prueba, recipiente de reacción, cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo multicelular. El término “célula *in vitro*” se refiere a cualquier célula que se cultiva *ex vivo*. En particular, una célula *in vitro* puede incluir una célula T o una célula NK. El término “*in vivo*” se refiere a eventos que ocurren dentro de un organismo multicelular, tal como un animal humano o no humano.

El término “aislado” se refiere a una sustancia que (1) se ha separado de al menos algunos componentes a los cuales se asoció en un momento anterior o a los cuales se asociaría, de cualquier otra manera, la sustancia, y/o (2) está presente en una composición que comprende una cantidad o concentración limitada o definida de uno o más contaminantes conocidos o desconocidos. Una sustancia aislada, en algunas modalidades, puede separarse de aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o mayor que aproximadamente 99 % (p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %) de otros componentes sin sustancia a los cuales se asoció la sustancia en un momento anterior, *p. ej.*, otros componentes o contaminantes a los cuales se asociaría, anteriormente o de cualquier otra manera, la sustancia. En ciertos casos, una sustancia se aísla si está presente en una composición que comprende una cantidad o concentración limitada o reducida de moléculas de un tipo igual o similar. Por ejemplo, en ciertos casos, un ácido nucleico, ADN o sustancia de ARN se aísla si está presente en una composición que comprende una cantidad o concentración limitada o reducida de moléculas de ácido nucleico sin sustancia, de ADN o de ARN. Por ejemplo, en ciertos casos, una sustancia de polipéptido se aísla si está presente en una composición que comprende una cantidad o concentración limitada o reducida de moléculas de polipéptido sin sustancia. En ciertas modalidades, una cantidad puede ser, *p. ej.*, una cantidad medida en relación con la cantidad de una sustancia deseada presente en una composición. En ciertas modalidades, una cantidad limitada puede ser una cantidad que no es mayor que 100 % de la cantidad de sustancia en una composición, *p. ej.*, no mayor que 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 %

de la cantidad de sustancia en una composición (p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95-100 %). En ciertos casos, una composición es pura o sustancialmente pura con respecto a una sustancia seleccionada. En algunas modalidades, una sustancia aislada es aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o mayor que aproximadamente 99 % pura (p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %). Una sustancia es “pura” si está sustancialmente libre de otros componentes o de contaminantes. En algunas modalidades, una sustancia puede aún considerarse “aislada” o incluso “pura”, después de haberse combinado con ciertos otros componentes tales como, por ejemplo, uno o más portadores o excipientes (*p. ej.*, regulador, solvente, agua, etc.); en tales modalidades, el porcentaje de aislamiento o pureza de la sustancia se calcula sin comprender tales portadores o excipientes.

“Enlazador” (L) o “dominio del enlazador” o “región del enlazador” se refiere a una región de oligo o polipéptido de aproximadamente 1 a 100 aminoácidos de longitud, por ejemplo que unen entre sí cualquiera de los dominios/regiones de un CAR, TCR, un receptor de TGF β negativo dominante y/o scFv, o incluso uno de más de esos polipéptidos juntos. Los enlazadores pueden componerse de residuos flexibles como glicina y serina de manera que los dominios de proteína adyacentes estén libres para moverse entre sí. Los enlazadores más largos pueden usarse cuando se desea asegurar que dos dominios adyacentes no interfieran estéricamente entre sí. Los enlazadores pueden ser escindibles o no escindibles. Los ejemplos de enlazadores escindibles incluyen enlazadores 2A (por ejemplo, T2A), enlazadores tipo 2A o equivalentes funcionales de estos y combinaciones de estos. En algunas modalidades, los enlazadores incluyen el enlazador tipo 2A picornaviral, secuencias CHYSEL (sec. con núm. de ident.: 1)

del teschovirus porcino (P2A), virus (T2A) o combinaciones, variantes y equivalentes funcionales de estos. En otras modalidades, las secuencias enlazadoras pueden comprender el dominio de Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly^(2A)-Pro^(2B) (sec. con núm. de ident.: 2), lo que da como resultado la escisión entre la glicina 2A y la prolina 2B. En algunos ejemplos, se usa un enlazador escindible para conectar un CAR o TCR con un receptor de TGF β negativo dominante. Otros enlazadores serán evidentes para los expertos en la técnica y pueden usarse en relación con esta descripción. Un enlazador puede ser una porción de un agente multielemento que conecta diferentes elementos entre sí. Por ejemplo, un polipéptido comprende dos o más dominios funcionales o estructurales pueden comprender un tramo de aminoácidos entre tales dominios que los unen entre sí. En algunas modalidades, un polipéptido que comprende un elemento del enlazador tiene una estructura general de la forma general S1-L-S2, en donde S1 y S2 pueden ser iguales o diferentes y representan dos dominios asociados entre sí por el enlazador. Un enlazador puede conectar o unir cualquiera de los dominios/regiones de un CAR o TCR. En algunas modalidades, un enlazador de polipéptidos es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más aminoácidos de longitud (*p. ej.*, 1 a 10, 1 a 20, 1 a 30, 1 a 40, 1 a 50, 1 a 60, 1 a 70, 1 a 80, 1 a 90, 1 a 100, 10 a 20, 10 a 30, 10 a 40, 10 a 50, 10 a 60, 10 a 70, 10 a 80, 10 a 90 o 10 a 100 aminoácidos de longitud). En algunas modalidades, un enlazador se caracteriza porque tiende a no adoptar una estructura tridimensional rígida y, en cambio, proporciona flexibilidad al polipéptido. En otro ejemplo, puede usarse para conectarse a o más polipéptidos a expresarse, tales como un CAR o TCR y un TGF β -DNR. En algunos ejemplos, el CAR o el TGF β -DNR se conectan mediante un enlazador escindible. Otros enlazadores incluyen enlazadores no escindibles. Se usa un número de enlazadores para realizar la presente invención que incluyen “enlazadores flexibles” Los últimos son ricos en glicina. Klein et al., Protein Engineering, Design

& Selection Vol. 27, No. 10, pp. 325–330, 2014; Priyanka et al., Protein Sci., 2013 Feb; 22(2): 153-167.

En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador sintético. Un enlazador sintético puede tener una longitud de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, p. ej., de 10 a 25 aminoácidos, de 25 a 50 aminoácidos, de 50 a 75 aminoácidos, de 75 a 100 aminoácidos, de 100 a 125 aminoácidos, de 125 a 150 aminoácidos, de 150 a 175 aminoácidos o de 175 a 200 aminoácidos. Un enlazador sintético puede tener una longitud de 10 a 30 aminoácidos, p. ej., 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos. Un enlazador sintético puede tener una longitud de 30 a 50 aminoácidos, p. ej., 30 a 35 aminoácidos, de 35 a 40 aminoácidos, de 40 a 45 aminoácidos, o de 45 o 50 aminoácidos.

En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador flexible. En algunas modalidades, el enlazador es rico en residuos de glicina (Gli o G). En algunas modalidades, el enlazador es rico en residuos de serina (Ser o S). En algunas modalidades, el enlazador es rico en residuos de glicina y serina.

El término “linfocito” incluye células destructoras naturales (NK), células T o células B. Las células NK son un tipo de linfocito citotóxico (tóxico para células) que representa un componente del sistema inmunitario inherente. Las células NK rechazan tumores y células infectadas por virus. Esto funciona a través del proceso de apoptosis o muerte celular programada. Se denominaron “destructoras naturales” porque no requieren activación para destruir células. Las células T desempeñan un papel en la inmunidad mediada por células (sin participación de anticuerpos). Sus receptores de células T (TCR) se diferencian por sí mismos de otros tipos de linfocitos. El timo, un órgano especializado del sistema inmunitario, es principalmente responsable de la maduración de las células T. Existen seis tipos de células T, a saber: células T colaboradoras (*p. ej.*, células CD4+), células T citotóxicas (también conocidas como TC, linfocito T citotóxico, CTL, células T destructoras, células T citolíticas, células T CD8+ o

células T destructoras), células T de memoria ((i) células T_{SCM} de memoria madre, como las células naive, son CD45RO⁻, CCR7⁺, CD45RA⁺, CD62L⁺ (L-selectina), CD27⁺, CD28⁺ e IL-7R α ⁺, pero también expresan grandes cantidades de CD95, IL-2R β , CXCR3, y LFA-1, y muestran numerosos atributos funcionales diferentes de las células de memoria); (ii) células T_{CM} de memoria central que expresan L-selectina y el CCR7, segregan IL-2, pero no IFN γ o IL-4, y (iii) células de memoria efectora, sin embargo, no expresan L-selectina o CCR7, pero producen citocinas efectoras como IFN γ e IL-4), células T reguladoras (Treg, células T supresoras o células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺), células T destructoras naturales (NKT) y células T gamma delta. Por otra parte, las células B desempeñan un papel en la inmunidad humoral (con participación del anticuerpo). Estas elaboran anticuerpos y antígenos y realizan el papel de las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) y se convierten en células B de memoria después de la activación por interacción de antígenos. En mamíferos, se forman células B inmaduras en la médula ósea, de donde se deriva su nombre.

El término “neutralizante” se refiere a una molécula de unión al antígeno, scFv, anticuerpo o un fragmento de este, que se fija a un ligando e impide o reduce el efecto biológico de ese ligando. En algunas modalidades, la molécula de unión al antígeno, scFv, anticuerpo o un fragmento de este, bloquea directamente un sitio de unión en el ligando o altera de cualquier otra manera la capacidad del ligando para unirse a través de medios indirectos (tales como alteraciones estructurales o energéticas en el ligando). En algunas modalidades, la molécula de unión al antígeno, scFv, anticuerpo o un fragmento de este evita que la proteína a la que se une realice una función biológica.

“Ácido nucleico” se refiere a cualquier cadena polimérica de nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser ADN, ARN o una combinación de estos. En algunas modalidades, un ácido nucleico comprende uno o más residuos de ácido nucleico natural. En algunas modalidades, un ácido nucleico comprende uno o más análogos de ácido nucleico. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos se preparan mediante uno o

más de aislamiento de una fuente natural, la síntesis enzimática por 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 es 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 prolongados (p. ej., 20 a 100, 20 a 500, 20 a 1000, 20 a 2000 o 20 a 5000 o más residuos). En algunas modalidades, un ácido nucleico es parcial o totalmente monocatenario; en algunas modalidades, un ácido nucleico es parcial o totalmente 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.

“Unido operativamente” se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera prevista. Por ejemplo, un elemento de control “*enlazado operativamente*” a un elemento funcional se asocia de tal manera que se logra la expresión y/o actividad del elemento funcional bajo condiciones compatibles con el elemento de control. En las modalidades, un promotor se une operativamente a nucleicos.

Un “paciente” incluye cualquier humano que está afectado con un cáncer (p. ej., mieloma múltiple). Los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente en la presente descripción.

Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente y se refieren a un compuesto que comprende residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o péptido contiene al menos dos aminoácidos, y ninguna limitación se coloca en el número máximo de aminoácidos que pueden comprender una secuencia de la proteína o del péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Como se usa en la presente

descripción, el término se refiere a tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica como proteínas, de las cuales existen muchos tipos. Los “polipéptidos” incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de estos.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a una molécula o composición que, cuando se administra a un receptor, no es perjudicial para el receptor de esta, o que cualquier efecto perjudicial se supera mediante un beneficio al receptor de este. Con respecto a un portador, diluyente o excipiente usado para formular una composición como se describe en la presente descripción, un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no perjudiciales para el receptor de este, o cualquier efecto perjudicial debe superarse mediante un beneficio al receptor. El término “portador farmacéuticamente aceptable” significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un agente de relleno, diluyente, excipiente o material encapsulante de solvente líquido o sólido, involucrado en portar o transportar un agente de una porción del cuerpo a otro (*p. ej.*, de un órgano a otro). Cada portador presente en una composición farmacéutica debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente, o cualquier efecto perjudicial debe superarse mediante un beneficio al receptor. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables comprenden: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados, tales como

carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de frijol de soya; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes reguladores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones reguladas con pH; poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en formulaciones farmacéuticas.

El término “composición farmacéutica” se refiere a una composición en la que un agente activo se formula junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. En algunas modalidades, el agente activo está presente en una cantidad de dosis unitaria adecuada para la administración en un régimen terapéutico que muestra una probabilidad estadísticamente significativa para lograr un efecto terapéutico predeterminado cuando se administra a un sujeto o población relevante. En algunas modalidades, una composición farmacéutica puede formularse para la administración en forma sólida o líquida, que comprende, sin limitación, una forma adaptada para lo siguiente: administración oral, por ejemplo, soluciones (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), tabletas, *p. ej.*, los dirigidos para absorción bucal, sublingual, y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento, o un rociador o parche de liberación controlada aplicado a la piel, pulmones o cavidad bucal; vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema, o

espuma; vía sublingual, vía ocular; vía transdérmica; vía nasal, pulmonar y a otras superficies mucosas.

El término “proliferación” se refiere a un incremento en la división celular, ya sea una división de células simétrica o asimétrica. En algunas modalidades, “proliferación” se refiere a la división simétrica o asimétrica de células T. El “incremento de la proliferación” ocurre cuando existe un incremento en el número de células en una muestra tratada en comparación con las células en una muestra no tratada.

El término “referencia” describe una norma o control en relación con la/el cual se realiza una comparación. Por ejemplo, en algunas modalidades, un agente, animal, individuo, población, muestra, secuencia, o valor de interés se compara con una referencia o control que es un agente, animal, individuo, población, muestra, secuencia o valor. En algunas modalidades, se evalúa, se mide y/o se determina sustancialmente simultáneamente una referencia o control con la prueba, medición o determinación de interés. En algunas modalidades, una referencia o control es una referencia o control histórico, opcionalmente incorporado en un medio tangible. Generalmente, se determina o se caracteriza una referencia o control bajo condiciones o circunstancias comparables a las que están bajo evaluación. Cuando están presentes suficientes similitudes para justificar la dependencia de y/o comparación con una referencia o control seleccionado.

“Células T reguladoras” (“Treg”, “células Treg” o “Tregs”) se refieren a un linaje de linfocitos T CD4+ que participan en el control de ciertas actividades inmunitarias, *p. ej.*, autoinmunidad, alergia y respuesta a la infección. Las células T reguladoras pueden regular las actividades de poblaciones de células T, y también pueden influir en ciertos tipos de células del sistema inmunitario innato. Las Tregs pueden identificarse mediante la expresión de los biomarcadores CD4, CD25 y Foxp3 y la baja expresión de CD127. Las células Treg de origen natural normalmente constituyen aproximadamente 5-10 % de los linfocitos T CD4+ periféricos. Sin embargo, las células Treg dentro de un microambiente tumoral (es decir, células Treg infiltrantes de

tumores), las células Treg pueden conformar tanto como 20-30 % de la población total de linfocitos T CD4+.

El término “muestra” se refiere, generalmente, a una alícuota de material obtenida o derivada de una fuente de interés. En algunas modalidades, una fuente de interés es una fuente biológica o ambiental. En algunas modalidades, una fuente de interés puede comprender una célula u organismo, tal como una población de células, tejido o animal (*p. ej.*, un humano). En algunas modalidades, una fuente de interés comprende tejido o líquido biológico. En algunas modalidades, un tejido o líquido biológico puede comprender líquido amniótico, humor acuoso, ascitis, bilis, médula ósea, sangre, leche materna, líquido cefalorraquídeo, cerumen, quilo, quimo, eyaculación, endolinfa, exudado, heces, ácido gástrico, jugo gástrico, linfa, mucosa, líquido pericárdico, perilinfa, líquido peritoneal, líquido pleural, pus, lagañas, saliva, sebo, semen, suero, esmegma, esputo, líquido sinovial, sudor, lágrimas, orina, secreciones vaginales, humor vítreo, vómito y/o combinaciones o componente(s) de estos. En algunas modalidades, un líquido biológico puede comprender un líquido intracelular, un líquido extracelular, un líquido intravascular (plasma sanguíneo), un líquido intersticial, un fluido linfático y/o un líquido transcelular. En algunas modalidades, un líquido biológico puede comprender un exudado de plantas. En algunas modalidades, puede obtenerse un tejido o muestra biológica, por ejemplo, mediante aspirado, biopsia (*p. ej.*, biopsia de tejido o con aguja fina), hisopo (*p. ej.*, hisopo oral, nasal, para piel, o hisopo vaginal), raspado, cirugía, lavado o lavado (*p. ej.*, broncoalveolar, ductal, nasal, ocular, oral, uterino, vaginal u otro lavado o lavado). En algunas modalidades, una muestra biológica comprende células obtenidas de un individuo. En algunas modalidades, una muestra es una “muestra primaria” obtenida directamente de una fuente de interés mediante cualquier medio adecuado. En algunas modalidades, como quedará claro por contexto, el término “muestra” se refiere a una preparación que se obtiene al procesar (*p. ej.*, al eliminar uno o más componentes de y/o al añadir uno o más agentes a) una muestra primaria. Tal

“muestra procesada” puede comprender, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas extraídos de una muestra u obtenidos al someter una muestra primaria a una o más técnicas tales como amplificación o transcripción inversa de ácido nucleico, aislamiento y/o purificación de ciertos componentes, etc.

“Fragmento variable monocatenario”, “fragmentos variables de anticuerpo monocatenario” o anticuerpos “scFv” se refieren a formas de anticuerpos que comprenden las regiones variables de solo las cadenas pesadas y ligeras, conectadas por un péptido enlazador.

El término “etapa de cáncer” se refiere a una evaluación cualitativa o cuantitativa del nivel de avance de un cáncer. En algunas modalidades, los criterios usados para determinar la etapa de un cáncer pueden comprender, sin limitación, uno o más de donde el cáncer se ubica en un cuerpo, el tamaño del tumor, si el cáncer se ha extendido a los nódulos linfáticos, si el cáncer se ha extendido a una o más partes diferentes del cuerpo, etc. En algunas modalidades, el cáncer puede desarrollarse en etapas usando el llamado sistema TNM, de acuerdo con el cual T se refiere al tamaño y extensión del tumor principal, usualmente llamado el tumor primario; N se refiere a la cantidad de nódulos linfáticos cercanos que tienen cáncer; y M se refiere a si el cáncer se ha propagado. En algunas modalidades, un cáncer puede denominarse como Etapa 0 (las células anormales están presentes sin haberse propagado al tejido cercano también llamado carcinoma *in situ*, o CIS; CIS no es cáncer, aunque podría volverse cáncer), Etapa I-III (el cáncer está presente; cuanto mayor es el número, más grande es el tumor y más se ha extendido en tejidos cercanos), o Etapa IV (el cáncer se ha extendido a partes distantes del cuerpo). En algunas modalidades, un cáncer puede asignarse a una etapa seleccionada del grupo que consiste en: *in situ*; localizado (el cáncer se limita al lugar donde inició, sin ningún signo de haberse extendido); regional (el cáncer se ha extendido a nódulos linfáticos, tejidos u órganos cercanos); distante (el cáncer se ha extendido a partes distantes del cuerpo); y desconocido (no existe suficiente información para determinar la etapa).

“Estimulación” se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora con su ligando cognado, en donde la unión media un evento de transducción de señal. Una “molécula estimuladora” es una molécula en una célula T, *p. ej.*, el complejo de receptor de células T (TCR)/CD3, que se une específicamente con un ligando estimulador cognado presente en una célula presentadora de antígeno. Un “ligando estimulador” es un ligando que cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (*p. ej.*, una APC, una célula dendrítica, una célula B y lo similar) pueden unirse específicamente con una molécula estimuladora en una célula T, que media, de esta manera, una respuesta primaria mediante la célula T, que incluye, pero no se limita a, la activación, inicio de una respuesta inmunitaria, proliferación y lo similar. Los ligandos estimuladores incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-CD3 (tal como OKT3), una molécula de clase I del MHC cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD2 superagonista y un anticuerpo anti-CD28 superagonista.

La frase “agente terapéutico” puede referirse a cualquier agente que provoca un efecto farmacológico deseado cuando se administra a un organismo. En algunas modalidades, se considera que un agente es un agente terapéutico si demuestra un efecto estadísticamente significativo a través de una población adecuada. En algunas modalidades, la población adecuada puede ser una población de organismos modelo o sujetos humanos. En algunas modalidades, una población adecuada puede definirse mediante varios criterios, tales como un cierto grupo de edad, género, antecedente genético, condiciones clínicas preexistentes, de acuerdo con la presencia o ausencia de un biomarcador, etc. En algunas modalidades, un agente terapéutico es una sustancia que puede usarse para aliviar, mejorar, aliviar, inhibir, prevenir, retrasar el inicio de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas modalidades, un agente terapéutico es un agente que ha sido o requiere ser aprobado por una agencia gubernamental antes de que pueda comercializarse para la administración a

humanos. En algunas modalidades, un agente terapéutico es un agente para el cual se requiere una prescripción médica para la administración a humanos.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva”, “dosis efectiva”, “cantidad efectiva” o “dosis terapéuticamente efectiva” de un agente terapéutico, *p. ej.*, células CAR T o células NK diseñadas genéticamente, es cualquier cantidad que, cuando se usa sola o en combinación con otro agente terapéutico, protege a un sujeto contra el inicio de una enfermedad o promueve la regresión de la enfermedad evidenciada por una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención de deterioro o discapacidad debido a la afección de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad puede evaluarse usando una variedad de métodos conocidos por los profesionales, tales como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelo animal que predicen la eficacia en humanos, o al analizar la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

Los términos “transducción” y “transducido” se refieren al proceso por el cual el ADN extraño se introduce en una célula a través del vector viral (*ver*, Jones et al., “Genetics: principles and analysis,” Boston: Jones & Bartlett Publ. (1998)). En algunas modalidades, el vector es un vector retroviral, un vector de ADN, un vector de ARN, un vector adenoviral, un vector baculoviral, un vector viral de Epstein Barr, un vector de papiloma virus, un vector viral vaccinia, un vector viral de herpes simple, un vector asociado a adenovirus, un vector lentiviral o cualquier combinación de estos.

“Transformación” se refiere a cualquier proceso mediante el cual se introduce ADN exógeno en una célula huésped. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales usando varios métodos. La transformación puede lograrse usando cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extrañas en una célula huésped procariota o eucariota. En algunas modalidades, se selecciona alguna metodología de

transformación basada en la célula huésped que se transforma y/o el ácido nucleico que va a insertarse. Los métodos de transformación pueden comprender, aún no se limitan a, infección viral, electroporación y lipofección. En algunas modalidades, una célula “transformada” se transforma establemente porque el ADN insertado es capaz de replicación ya sea como un plásmido autónomamente replicante o como parte del cromosoma huésped. En algunas modalidades, una célula transformada puede expresar ácido nucleico introducido.

“Tratamiento” o “tratar” un sujeto se refiere a cualquier tipo de intervención o proceso realizado sobre, o la administración de un agente activo a, el sujeto con el objetivo de invertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o prevenir el inicio, progresión, desarrollo, gravedad o recurrencia de un síntoma, complicación o afección, o marcas distintivas bioquímicas asociadas con una enfermedad. En una modalidad, “tratamiento” o “tratar” incluye una remisión parcial. En otra modalidad, “tratamiento” o “tratar” incluye una remisión completa. En algunas modalidades, el tratamiento puede ser de un sujeto que no presenta signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o de un sujeto que exhibe presenta solo signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas modalidades, tal tratamiento puede ser de un sujeto que presenta uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. En algunas modalidades, el tratamiento puede ser de un sujeto que se le ha diagnosticado que padece de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. En algunas modalidades, el tratamiento puede ser de un sujeto conocido por tener uno o más factores de susceptibilidad que se correlacionan estadísticamente con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante.

El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico receptora modificada para comprender o incorporar una secuencia de ácido nucleico proporcionada. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a una molécula de ADN bicatenario circular en la que puede ligarse ADN adicional. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde pueden ligar segmentos de ADN adicionales

en el genoma viral. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en el que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de vectores de mamíferos episomales y replicación). Otros vectores (p. ej., vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras introducirse en la célula huésped y, de esta manera, se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores comprenden secuencias que dirigen la expresión de genes insertados a los que se unen operativamente. Tales vectores pueden denominarse en la presente descripción “vectores de expresión”. Pueden usarse técnicas estándar para diseñar genéticamente vectores, p. ej., como se encuentra en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se incorpora en la presente descripción como referencia.

El término “secuencia” se refiere a una secuencia de nucleótidos de cualquier longitud, que puede ser de ADN o ARN; puede ser lineal, circular o ramificada y puede ser ya sea monocatenario o bicatenario. El término “secuencia donante” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se inserta en un genoma. Una secuencia donante puede ser de cualquier longitud, por ejemplo, entre 2 y 10.000 nucleótidos de longitud (o cualquier valor entero entre estos o por encima de estos), preferentemente, entre aproximadamente 100 y 1.000 nucleótidos de longitud (o cualquier número entero entre estos), con mayor preferencia, entre aproximadamente 200 y 500 nucleótidos de longitud.

Un “gen”, para los propósitos de la presente descripción, incluye una región de ADN que codifica un producto génico (ver infra), así como todas las regiones de ADN que regulan la producción del producto génico, ya sea que tales secuencias reguladoras estén o no adyacentes a secuencias de codificación y/o transcritas. Por consiguiente, un gen incluye, pero no se limita necesariamente a, secuencias promotoras, terminadores, secuencias reguladoras traduccionales tales como sitios de unión al ribosoma y sitios de entrada de ribosoma internos, potenciadores, silenciadores,

aislantes, elementos de frontera, orígenes de replicación, sitios de acoplamiento a la matriz y regiones de control del locus.

Un “dominio transmembrana” es un dominio de un polipéptido que incluye al menos una secuencia de aminoácidos contiguos que atraviesa una bicapa lipídica cuando está presente en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresa en una célula de mamífero. Por ejemplo, un dominio transmembrana puede incluir una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez secuencias de aminoácidos contiguos que atraviesan, cada una, una bicapa lipídica cuando está presente en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresa en una célula de mamífero. Un dominio transmembrana puede, p. ej., incluir al menos una (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez) secuencia de aminoácidos contiguos (que atraviesa una bicapa lipídica cuando está presente en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresa en una célula de mamífero) que tiene una estructura secundaria α -helicoidal en la bicapa lipídica. En algunas modalidades, un dominio transmembrana puede incluir dos o más secuencias de aminoácidos contiguos (cada una cruza una bicapa lipídica cuando está presente en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresa en una célula de mamífero) que forman una estructura secundaria de barril β en la bicapa lipídica. Los ejemplos no limitantes de dominios transmembrana se describen en la presente descripción. Los ejemplos adicionales de dominios transmembrana se conocen en la técnica.

La frase “lado extracelular de la membrana plasmática” cuando se usa para describir la ubicación de un polipéptido significa que el polipéptido incluye al menos un dominio transmembrana que atraviesa la membrana plasmática y al menos un dominio (p. ej., al menos un dominio de unión al antígeno) que se ubica en el espacio extracelular.

La descripción puede usar, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos de química, bioquímica, química orgánica, biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante, genética, inmunología y biología

celular que están dentro de la experiencia de la técnica, muchos de los cuales se describen más abajo para el propósito de ilustración. Tales técnicas se explican totalmente en la literatura. Ver, p. ej., Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, actualizado en julio de 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; así como las monografías en los diarios tales como *Advances in Immunology*.

La presente descripción proporciona agentes de unión al antígeno, tales como anticuerpos, receptores de antígeno quimérico (los CAR) y receptores de células T (los TCR) que comprenden al menos un dominio de unión al antígeno único que se une a glipican 3 (GPC3), denominado en la presente descripción como un dominio de unión al GPC3. Entre otras cosas, la presente descripción proporciona métodos y composiciones útiles para el tratamiento del cáncer y/o para iniciar o modular respuestas inmunitarias. En varias modalidades, el dominio de unión al GPC3 es un scFv. Las secuencias de aminoácidos de dominio de unión al GPC3 ilustrativas, y las secuencias de ácido nucleico que codifican las mismas, se proporcionan en la presente descripción, por ejemplo, en las Tablas 4-8. En algunas modalidades, el dominio de unión al GPC3 de la presente descripción está compuesto por un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas modalidades, el dominio de unión al GPC3 de la presente descripción está compuesto por un receptor de células T (TCR). En algunas

modalidades, un agente de unión al antígeno de la presente descripción es un receptor de células T (TCR) diseñadas genéticamente. En algunas modalidades, los CAR y/o TCR se expresan con un receptor de TFG β negativo dominante (DN TFG β R). En algunas modalidades, los CAR y/o TCR se expresan con una membrana unida a interleucina 15 (IL-15), un receptor quimérico de dominio sushi de IL-15R α . Se describen anticuerpos y fragmentos de estos que incluyen un dominio de unión al GPC3, tal como se describen en las Tablas 4-8.

Varias modalidades de la presente descripción proporcionan un vector que codifica un dominio de unión al GPC3 o un agente de unión al GPC3 proporcionado en la presente descripción, p. ej., un vector que codifica un CAR o TCR de unión al GPC3. Varias modalidades de la presente descripción proporcionan un vector que codifica un DN TFG β R, p. ej., un vector que codifica un CAR de unión al GPC3 y un DN TFG β R. En algunas modalidades, el DN TFG β R se codifica en un vector separado del vector que codifica el CAR o TCR de unión al GPC3. En algunas modalidades, el DN TFG β R se codifica en el mismo vector que codifica el CAR o TCR de unión al GPC3. Varias modalidades de la presente descripción proporcionan un vector que codifica un receptor quimérico de dominio sushi de IL-15-IL-15R α , p. ej., un vector que codifica un CAR de unión al GPC3 y un receptor quimérico de dominio sushi de IL-15-IL-15R α . En algunas modalidades, el receptor quimérico de dominio sushi de IL-15-IL-15R α se codifica en un vector separado del vector que codifica el CAR o TCR de unión al GPC3. En algunas modalidades, el receptor quimérico de dominio sushi de IL-15-IL-15R α se codifica en el mismo vector que codifica el CAR o TCR de unión al GPC3.

Varias modalidades de la presente descripción proporcionan un agente de unión al GPC3 que es una célula que codifica o expresa un CAR o TCR de unión al GPC3, p. ej., una célula T o célula NK diseñada genéticamente para codificar o expresar un CAR o TCR de unión al GPC3. La presente descripción proporciona células inmunitarias modificadas genéticamente con un gen integrado, p. ej., una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR o TCR de unión al GPC3 (p. ej., un

constructo de expresión constitutiva y/o un constructo de expresión inducible que comprende tal secuencia de nucleótidos). En algunas modalidades, las células inmunitarias se diseñan genéticamente además para expresar un DN TFG β R. En las modalidades, las células inmunitarias se diseñan genéticamente además para expresar un receptor quimérico de dominio sushi de L-15-IL-15R α . En algunas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para tratar a un sujeto que tiene un tumor, tal como un HCC, que comprende administrar al sujeto una terapia con agente de unión al GPC3 descrita en la presente descripción y/o una proteína terapéutica descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, los métodos comprenden además la administración de uno o más terapias adicionales (*p. ej.*, un segundo agente de unión (*p. ej.*, célula CAR T, célula CAR-NK, célula TCR-T, célula TIL, célula NK alogénica y célula NK autóloga), un conjugado anticuerpo-fármaco, un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo biespecífico de acoplamiento a células T, un anticuerpo diseñado genéticamente y/o un polipéptido descrito en la presente descripción).-----

Un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción puede comprender secuencias de unión al antígeno como se encuentran en un anticuerpo descrito en la presente, *p. ej.*, los mAb 1-5 como se describe en las Tablas 4-8. En algunos casos, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende un dominio de unión al GPC3 descrito en la presente descripción, tal como un scFv. A menos que se indique de cualquier otra manera, se apreciará que las referencias a GPC3 en la presente descripción se relacionan con GPC3 humano. El glipican 3 (GPC3, gen NCBI con ident. núm. 2719 según se actualizó al 10 de abril de 2021, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad) es un miembro de la familia de proteoglicano de membrana integral relacionada con glipican (GRIPS, por sus siglas en inglés). El GPC3 contiene una proteína núcleo anclada a la membrana citoplasmática a través de un enlace glicosil fosfatidilinositol. El GPC3 se expresa en una serie de tipos de cáncer, que incluyen carcinoma

hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés) y carcinoma de células escamosas de pulmón (SCC, por sus siglas en inglés).

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende al menos una CDR de cadena pesada (HCDR) proporcionada en la presente descripción, p. ej., al menos una HCDR descrita en la Tabla 4. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende dos HCDR proporcionadas en la presente descripción, p. ej., al menos dos HCDR descritas en la Tabla 4. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende tres HCDR proporcionadas en la presente descripción, p. ej., tres HCDR descritas en la Tabla 4. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende al menos una CDR de cadena ligera (LCDR, por sus siglas en inglés) proporcionada en la presente descripción, p. ej., al menos una LCDR descrita en la Tabla 4. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende dos LCDR proporcionadas en la presente descripción, p. ej., al menos dos LCDR descritas en la Tabla 4. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende tres LCDR proporcionadas en la presente descripción, p. ej., tres LCDR descritas en la Tabla 4.

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende al menos una HCDR proporcionada en la presente descripción, *p. ej.*, al menos una HCDR descrita en la Tabla 4, y al menos una LCDR proporcionada en la presente descripción, *p. ej.*, al menos una LCDR descrita en la Tabla 4. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende dos HCDR proporcionadas en la presente descripción, *p. ej.*, al menos dos HCDR descritas en la Tabla 4, y al menos dos LCDR proporcionadas en la presente descripción, *p. ej.*, al menos dos LCDR descritas en la Tabla 4. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende tres HCDR proporcionadas en la presente descripción, *p. ej.*, tres HCDR descritas

en la Tabla 4, y tres LCDR proporcionadas en la presente descripción, *p. ej.*, tres LCDR descritas en la Tabla 4.

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende al menos una región marco de cadena pesada (FR de cadena pesada) de un dominio variable de cadena pesada descrita en la presente descripción, *p. ej.*, al menos una FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descrita en cualquiera de las Tablas 4-8. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende dos FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descritas en la presente descripción, *p. ej.*, al menos dos FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descritas en una cualquiera de las Tablas 4-8. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende tres FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descritas en la presente descripción, *p. ej.*, tres FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descritas en una cualquiera de las Tablas 4-8.

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende al menos una FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descrita en la presente descripción, *p. ej.*, al menos una FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende dos FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descritas en la presente descripción, *p. ej.*, al menos dos FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descritas en una cualquiera de las Tablas 4-8. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende tres FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descritas en la presente descripción, *p. ej.*, tres FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descritas en una cualquiera de las Tablas 4-8.

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende al menos una FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena

pesada descrita en la presente descripción, *p. ej.*, al menos una FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8, y al menos una FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descrita en la presente descripción, *p. ej.*, al menos una FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende una FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descrita en la presente descripción, *p. ej.*, al menos una FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8, y una FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descrita en la presente descripción, *p. ej.*, derivada de la misma Tabla de las Tablas 4-8 como la(las) FR(s) de cadena pesada. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende dos FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descrita en la presente descripción, *p. ej.*, al menos dos FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descritas en una cualquiera de las Tablas 4-8, y dos FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descritas en la presente descripción, *p. ej.*, al menos dos FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descritas en una cualquiera de las Tablas 4-8. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende dos FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descritas en la presente descripción, *p. ej.*, al menos dos FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descritas en una cualquiera de las Tablas 4-8, y dos FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descritas en la presente descripción, *p. ej.*, derivada de la misma Tabla de las Tablas 4-8 como la(las) FR(s) de cadena pesada. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende tres FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descritas en la presente descripción, *p. ej.*, tres FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descrita en

una cualquiera de las Tablas 4-8, y tres FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descritas en la presente descripción, *p. ej.*, tres FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descritas en una cualquiera de las Tablas 4-8. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende tres FR de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descrita en la presente descripción, *p. ej.*, tres FR de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descritas en una cualquiera de las Tablas 4-8, y tres FR de cadena ligera derivada de la misma Tabla de las Tablas 4-8 como la(las) FR(s) de cadena pesada.

Las secuencias de anticuerpos ilustrativas proporcionadas en las Tablas 4-8 son adecuadas para usarse en cualquier formato de anticuerpo, que comprende, *p. ej.*, un anticuerpo tetramérico, un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de unión al antígeno, o un dominio de unión. Los dominios variables de cadena pesada y los dominios variables de cadena ligera y porciones de estos proporcionados en las Tablas 4-8 pueden estar comprendidos en un dominio de unión al GPC3.

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende una, dos o tres FR que juntas o de manera individual tienen al menos 75 % de identidad (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 %, *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %) a la(s) FR(s) correspondiente(s) de un dominio variable de cadena pesada de un dominio variable de cadena pesada descrita(s) en una cualquiera de las Tablas 4-8. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende una, dos o tres FR que juntas o de manera individual, tienen al menos 75 % de identidad (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 %) a la(s) FR(s) correspondiente(s) de un dominio variable de cadena ligera de un dominio variable de cadena ligera descrita(s) en una cualquiera de las Tablas 4-8.

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende al menos un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos

75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena pesada descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %). En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende dos dominios variables de cadena pesada que tienen, cada uno, al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena pesada descrita en las Tablas 4-8 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %), cuyos dominios variables de cadena pesada pueden ser iguales o diferentes.

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende al menos un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena ligera descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %). En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende dos dominios variables de cadena ligera que tienen, cada uno, al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena ligera descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %), cuyos dominios variables de cadena ligera pueden ser iguales o diferentes.

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende al menos un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena pesada descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %) y al menos un dominio variable de cadena ligera que

tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena ligera descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %). En ciertas modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena pesada descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %) y un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena ligera descrita en una cualquiera de las Tablas 4-8 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %), donde el dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera se derivan, opcionalmente, de la misma Tabla de las Tablas 4-8.

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende dos dominios variables de cadena pesada que tienen, cada uno, al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena pesada descrita en las Tablas 4-8 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %) y dos dominios variables de cadena ligera que tienen, cada uno, al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena ligera descrita en las Tablas 4-8 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %), donde, en varias modalidades, (i) cada uno de los dominios variables de cadena pesada puede ser igual o diferente; (ii) cada uno de los dominios variables de cadena ligera puede ser igual o diferente; (iii) al menos un dominio variable de cadena pesada y al menos un dominio variable de cadena ligera pueden derivarse de la misma tabla de las Tablas 4-8; o (iv) los dos dominios

variables de cadena pesada y los dos dominios variables de cadena ligera se derivan todos de la misma tabla de las Tablas 4-8.

Cada una de las Tablas 4-8 representa las secuencias de dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo ilustrativo, que comprenden (i) el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo ilustrativo; (ii) una secuencia de ADN que codifica el dominio variable de cadena pesada (iii) tres CDR de dominio variable de cadena pesada del dominio variable de cadena pesada, de acuerdo con la numeración de IMGT, Kabat y Chothia, (iv) el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo ilustrativo; (v) una secuencia de ADN que codifica el dominio variable de cadena ligera; y (vi) tres CDR de dominio variable de cadena ligera del dominio variable de cadena ligera, de acuerdo con la numeración de IMGT, Kabat y Chothia. La información proporcionada en cada tabla proporciona secuencias de aminoácidos marco, así como secuencias de nucleótidos que codifican cada secuencia de aminoácidos de la CDR y secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de la FR correspondiente.

En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 puede comprender un dominio variable de cadena pesada de la presente descripción (*p. ej.*, que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena pesada de una cualquiera de las Tablas 4-8, *p. ej.*, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %), un dominio variable de cadena ligera de la presente descripción (*p. ej.*, que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena ligera descrita de una cualquiera de las Tablas 4-8, *p. ej.*, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %), y un enlazador (*p. ej.*, un enlazador de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 59. En varias modalidades, un dominio de unión al GPC3 puede comprender una secuencia líder, un dominio variable de cadena pesada de la presente descripción (*p. ej.*, que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena pesada de una cualquiera de las Tablas 4-8, *p. ej.*, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %,

o 100 % de identidad; p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %), un dominio variable de cadena ligera de la presente descripción (p. ej., que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena ligera descrita de una cualquiera de las Tablas 4-8, *p. ej.*, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % de identidad; p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %) y un enlazador. Si se proporciona con una secuencia de aminoácidos o nucleótidos de un dominio de unión al GPC3 que comprende un dominio variable de cadena pesada de la presente descripción y un dominio variable de cadena ligera de la presente descripción, el enlazador que une los dos dominios variables será evidente desde la secuencia en vista de la presente descripción. Si se proporciona con una secuencia de aminoácidos o nucleótidos de un dominio de unión al GPC3 que comprende un dominio variable de cadena pesada de la presente descripción y un dominio variable de cadena ligera de la presente descripción, la secuencia líder será evidente en vista de la presente descripción. Para evitar dudas, un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera de la presente descripción pueden estar presentes en cualquier orientación, *p. ej.*, una orientación en la que el dominio variable de cadena pesada es C terminal del dominio variable de cadena ligera o en el que el dominio variable de cadena pesada es N terminal del dominio variable de cadena ligera. En diversas modalidades, un dominio de unión al GPC3 puede comprender un enlazador de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 59.

En ciertas modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende un dominio de unión al GPC3 que comprende un dominio variable de cadena pesada de la presente descripción, un dominio variable de cadena ligera de la presente descripción, y un enlazador que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 59 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %). En ciertas modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende un dominio de unión al GPC3 que comprende un enlazador de acuerdo con la sec. con núm. de

ident.: 59. En ciertas modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende un dominio de unión al GPC3 que comprende un dominio variable de cadena pesada de la presente descripción, un dominio variable de cadena ligera de la presente descripción, y una secuencia líder que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 79 (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %). En ciertas modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende un dominio de unión al GPC3 que comprende una secuencia líder CSF2RA de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 79 (MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP; sec. con núm. de ident.: 79) En las modalidades, una secuencia líder puede codificarse mediante una secuencia de ácido nucleico al menos 75 % de identidad de secuencia con

ATGCTGTTATTAGTGACCTCTTTACTGCTGTGTGAGCTGCCCCACCCCGCTT TCCTCCTCATCCCG (sec. con núm. de ident.: 82) (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %). En ciertas modalidades, un dominio de unión al GPC3 de la presente descripción comprende un dominio de unión al GPC3 que comprende un dominio variable de cadena pesada de la presente descripción, un dominio variable de cadena ligera de la presente descripción, un enlazador de la presente descripción, y una secuencia líder de la presente descripción.

Un agente de unión de la presente descripción que se basa en un anticuerpo ilustrativo proporcionado en la presente descripción, tal como, por ejemplo, los Ab 1-5, puede proporcionarse en cualquier fragmento o formato, que comprende un dominio variable de cadena pesada de acuerdo con el anticuerpo ilustrativo y un dominio variable de cadena ligera indicados de acuerdo con el anticuerpo ilustrativo indicado.

Tabla 4: Secuencias de anticuerpos 1 ilustrativas (mAb1-1)

Sec. con núm. de ident.:	Descripción	Secuencia
3	Dominio variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLE WMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNDYDAWFVYWGQGLTVSS
4	VH (ADN)	CAAGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCCGG AGCCAGCGTGAAAAGTCTCATGTAAAACCGAGCGGTACACCTTCAC CGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAAGCCCCCGGTCAAGGTTT AGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGTCCGGCAACACCTACT ACGCCAGAAGTTCCAAGTCTGTGTGACCATGACAGCCGACACC AGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGTCTCTCTGCGTTCTGAG GACACAGCCGTTTACTACTGCGCCAGAGGCAACGACTACGACGC TTGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTGTCTC C
5	IMGT de CDRH1 (Prot)	GYTFTDYY
6	Kabat de CDRH1 (Prot)	DYYIH
7	Chothia de CDRH1 (Prot)	GYFTD
8	IMGT de CDRH2 (Prot)	IYPGSGNT
9	Kabat de CDRH2 (Prot)	EIYPGSGNTYYAQKFQ
10	Chothia de CDRH2 (Prot)	YPGSG
11	IMGT de CDRH3 (Prot)	ARGNDYDAWFVY
12	Kabat de CDRH3 (Prot)	GNDYDAWFVY
13	Chothia de CDRH3 (Prot)	GNDYDAWFVY
14	Dominio variable de cadena ligera	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLNLSGTRKKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYY CKQSYSLYTFGQGTKLEIK
15	VL (ADN)	GACATCGTCATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGTCTTTA GGCGAAAGAGTGACCATGAACTGCAAGTCCAGCCAGTCTTTACTG AATTCCGGCACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAA CCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCTAGCATTCTG AGAATCCGGCGTGCCCGATCGCTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGCA CCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGAGGACGTGG CTGTGTACTATTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGCCA AGGAACAAAGCTGGAGATCAAG
16	IMGT de CDRL1 (Prot)	QSLNLSGTRKNY
17	Kabat de CDRL1 (Prot)	KSSQSLNLSGTRKNYLA
18	Chothia de CDRL1 (Prot)	KSSQSLNLSGTRKNYLA

19	IMGT de CDRL2 (Prot)	WAS
20	Kabat de CDRL2 (Prot)	WASIRES
21	Chothia de CDRL2 (Prot)	WASIRES
22	IMGT de CDRL3 (Prot)	KQSYSLYT
23	Kabat de CDRL3 (Prot)	KQSYSLYT
24	Chothia de CDRL3 (Prot)	KQSYSLYT
25	ScFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLE WMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTK GDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLNSGTRKKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVY YCKQSYSLYTFGQGTKLEIK
26	ScFv	CAAGTCCAAGTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCCGG AGCCAGCGTGAAAGTCTCATGTAAAACAGCGGCTACACCTTCAC CGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAAGCCCCCGGTCAAGGTTT AGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCTCCGGCAACACCTACT ACGCCCAGAAGTTCCAAGGTCGTGTGACCATGACAGCCGACACC AGCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGTCTCTCTGCGTTCTGAG GACACAGCCGTTTACTACTGCGCCAGAGGCAACGACTACGACGC TTGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTGTCTC CGGATCCACATCCGGCAGCGGAAAGCCCGGTAGCGGCGAGGGC AGCACCAAAGGAGACATCGTTCATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTA GCCGTGTCTTTAGGCGAAAGAGTGACCATGAACTGCAAGTCCAG CCAGTCTTTACTGAATTCCGGCACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGG TACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTG GGCTAGCATTGAGAATCCGGCGTGCCCGATCGCTTTAGCGGCA GCGGTAGCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCAA GCTGAGGACGTGGCTGTGTACTATTGCAAGCAGTCTACTCTTTA TACACCTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGAGATCAAG

Tabla 5: Secuencias de anticuerpos 2 ilustrativas (mAb1-2)

Sec. con núm. de ident.:	Descripción	Secuencia
27	Dominio variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLE WMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLTVTVSS
28	VH (ADN)	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCCGG CGCCAGCGTGAAAGTCTCATGCAAGGCCAGCGGCTATACCTTCA CCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAAGCTCCCGGTCAAGGTT TAGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCAGCGGCAACACCTAC TACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGTGACCATGACTCGTGACAC CTCCACCTCCACCGTGTATATGGAGCTGAGCTCTTTAAGGTCCGA GGATACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGAGGAAACGACTACGACG CTTGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTCAGCT CC
29	Dominio variable de cadena ligera	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCK QSYSLYTFGQGTKLEIK
30	VL (ADN)	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCTGTGTCTTTA GGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCTCCAGAGCTTATTA

		AATAGCGGCACTCGAAAAAAGCTATTTAGCTTGGTACCAACAGAAG CCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTCATCTACTGGGCTTCCATCAG AGAGAGCGGCGTGCCCCGATAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACAGACTTCACTTTAACCATCTCCTCTTTACAAGCTGAGGACGTG GCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGC CAAGGAACAAAGCTGGAGATCAAA
31	ScFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLE WMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTDRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARGNDYDAWFVYWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTK GDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC KQSYSLYTFGQGTKLEIK
32	ScFv	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCCGG CGCCAGCGTGAAAGTCTCATGCAAGGCCAGCGGCTATACCTTCA CCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAAGCTCCCGGTCAAGGTT TAGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCAGCGGCAACACCTAC TACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGTGACCATGACTCGTGACAC CTCCACCTCCACCGTGTATATGGAGCTGAGCTCTTTAAGGTCCGA GGATACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGAGGAAACGACTACGACG CTTGTTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTCAGCT CCGGCTCCACAAGCGGATCCGGCAAACCCGGTAGCGGCGAAGG CAGCACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTT TAGCTGTGTCTTTAGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCT CCCAGAGCTTATTAATAGCGGCACTCGAAAAAAGCTATTTAGCTTG GTACCAACAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTCATCTACT GGGCTTCCATCAGAGAGAGCGGCGTGCCCCGATAGATTCAGCGGC AGCGGCTCCGGCACAGACTTCACTTTAACCATCTCCTCTTTACAA GCTGAGGACGTGGCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTA TACACCTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGAGATCAAA

Tabla 6: Secuencias de anticuerpos 3 ilustrativas (mAb1-3)

Sec. con núm. de ident.:	Descripción	Secuencia
33	Dominio variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLE WMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNDYDAWFVYWGQGLTVTVSS
34	VH (ADN)	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCCGG CGCCAGCGTGAAAGTCTCATGCAAGACCTCCGGCTACACCTTAC CGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAAGCTCCCGGCCAAGGTC TGGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCTCCGGCAACACCTAT TACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGTGACCATGACAGCCGACAC CTCCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTACGAGCTTACGTAGCG AGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTCGTGGCAACGACTACGAC GCTTGTTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAAGTCTGGTGACCGTGTC CTCC
35	Dominio variable de cadena ligera	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCK QSYSLYTFGQGTKLEIK
36	VL (ADN)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCGATTCTTTAGCCGTCAGCCTT GGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCTTATT AAACTCCGGCACTCGAAAAAAGTACCTCGCTTGGTACCAGCAGAA GCCCGGTGAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCATTC GTGAGAGCGGAGTGCCCGACAGATTTAGCGGCTCCGGCAGCGG CACCGATTTCACTTTAACCATCAGCTCTTTACAAGCTGAGGATGTG GCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGC CAAGGAACAAAGCTGGAGATTAAG
37	ScFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLE WMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTA

		VYYCARGNDYDAWFVYWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTK GDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC KQSYSLYTFGQGTKLEIK
38	ScFv	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAAGCCCGG CGCCAGCGTGAAAGTCTCATGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCAC CGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAAGCTCCCGGCCAAGGTC TGGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCTCCGGCAACACCTAT TACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGTGACCATGACAGCCGACAC CTCCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCTTACGTAGCG AGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTCGTGGCAACGACTACGAC GCTTGTTCTGTGTACTGGGGCCAAGGAAGTCTGGTGACCGTGTC CTCCGGAAGCACCTCCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAGCGGCGAA GGATCCACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCGATTCT TTAGCCGTCAGCCTTGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGA GCAGCCAGAGCTTATTAAGTCCGGCACTCGAAAAAACTACCTCG CTTGTTACCAGCAGAAGCCCGGTGAGCCCCCTAAGTACTGATC TACTGGGCCAGCATTCGTGAGAGCGGAGTGCCCCGACAGATTTAG CGGCTCCGGCAGCGGCACCGATTTCATTTAACCATCAGCTCTTT ACAAGCTGAGGATGTGGCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCTTACTC TTTATACACCTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGAGATTAAG

Tabla 7: Secuencias de anticuerpos 4 ilustrativas (mAb1-4)

Sec. con número de ident.:	Descripción	Secuencia
39	Dominio variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLE WIGEIYPGSGNTYYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEFSSLRSEDTAV YYCARGNDYDAWFVYWGQGLTVTVSS
40	VH (ADN)	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCCG GTGCCTCCGTGAAGGTGTCTTGTAAGACCAGCGGCTACACCTTCA CCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAAGCTCCCGGTCAAGGTT TAGAGTGGATTGGCGAGATCTATCCCGGCAGCGGCAACACCTAC TACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGCCACTTTAACCGCTGACACC AGCACCAGCACCGCCTACATGGAGTTCTCCTCTTTAAGGAGCGAG GACACCGCCGTGTATTACTGCGCTCGTGGCAACGACTATGACGC TTGGTTCGTGTACTGGGGTCAAGGAACATTAGTGACAGTGAGCAG C
41	Dominio variable de cadena ligera	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCK QSYSLYTFGQGTKLEIK
42	VL (ADN)	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCTGTGAGCCTT GGAGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCTCCAGTCTTTACTG AACAGCGGCACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAA CCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCCATTCT TGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTGAGCGGCAGCGGCTCCGGAA CCGACTTTACTTTAACCATCTCCTCTTTACAAGCTGAGGACGTGG CTGTGTACTACTGCAAGCAGAGCTACTCTTTATACACCTTCGGCC AAGGAACAAAGCTGGAAATCAAG
43	ScFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLE WIGEIYPGSGNTYYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEFSSLRSEDTAV YYCARGNDYDAWFVYWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKG DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCK QSYSLYTFGQGTKLEIK
44	ScFv	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCCG GTGCCTCCGTGAAGGTGTCTTGTAAGACCAGCGGCTACACCTTCA CCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAAGCTCCCGGTCAAGGTT TAGAGTGGATTGGCGAGATCTATCCCGGCAGCGGCAACACCTAC

		TACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGCCACTTTAACCCTGACACC AGCACCAGCACCCTACATGGAGTTCTCTCTTTAAGGAGCGAG GACACCGCCGTGTATTACTGCGCTCGTGGCAACGACTATGACGC TTGGTTCGTGTACTGGGGTCAAGGAACATTAGTGACAGTGAGCAG CGGATCCACCAGCGGATCCGGCAAGCCCGGTAGCGGAGAAGGC AGCACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTT AGCTGTGAGCCTTGAGAGAGGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCT CCCAGTCTTTACTGAACAGCGGCACTCGAAAAAATATTTAGCTT GGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTAC TGGGCCTCCATTCTGTAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTACGCGG CAGCGGCTCCGGAACCGACTTTACTTTAACCATCTCCTCTTTACAA GCTGAGGACGTGGCTGTGTACTACTGCAAGCAGAGCTACTCTTTA TACACCTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGAAATCAAG
--	--	---

Tabla 8: Secuencias de anticuerpos 5 ilustrativas (mAb1-5)

Sec. con núm. de ident.:	Descripción	Secuencia
45	Dominio variable de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLE WIGEIYPGSGNTYYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEFSSLRSEDAV YYCARGNDYDAWFVYWGQGLTVTVSS
46	VH (ADN)	CAAGTTCAGCTGGTCCAGAGCGGCGCTGAAGTGAAGAAGCCCGG CGCTAGCGTCAAAGTCTCATGCAAAACCTCCGGCTACACCTTTAC CGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAAGCTCCCGGTCAAGGTCT GGAGTGGATCGGCGAGATCTACCCCGGCAGCGGCAACACCTACT ACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGCCACTTTAACCCTGACACCA GCACCTCCACCGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAAGGTCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGTGGCAACGATTACGACGCTT GGTTCGTGTACTGGGGACAAGGAACATTAGTGACCGTGTCCAGC
47	Dominio variable de cadena ligera	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLNLSGTRKKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYY CKQSYSLYTFGQGTKLEIK
48	VL (ADN)	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGTCTTTA GGAGAGAGAGTGACCATGAACTGCAAGAGCAGCCAGTCTTTACT GAACAGCGGCACCAGAAAGAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAA GCCCCGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCATTC GTGAGAGCGGAGTGCCCGACAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGG CACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGAGGATGT GGCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTTGG CCAAGGAACAAAGCTGGAGATCAAA
49	ScFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLE WIGEIYPGSGNTYYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEFSSLRSEDAV YYCARGNDYDAWFVYWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKG DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLNLSGTRKKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYY CKQSYSLYTFGQGTKLEIK
50	ScFv	CAAGTTCAGCTGGTCCAGAGCGGCGCTGAAGTGAAGAAGCCCGG CGCTAGCGTCAAAGTCTCATGCAAAACCTCCGGCTACACCTTTAC CGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAAGCTCCCGGTCAAGGTCT GGAGTGGATCGGCGAGATCTACCCCGGCAGCGGCAACACCTACT ACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGCCACTTTAACCCTGACACCA GCACCTCCACCGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAAGGTCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGTGGCAACGATTACGACGCTT GGTTCGTGTACTGGGGACAAGGAACATTAGTGACCGTGTCCAGC GGCAGCACAAGCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAGCGGCGAGGGAA GCACCAAGGGCGATATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTA GCCGTGTCTTTAGGAGAGAGAGTGACCATGAACTGCAAGAGCAG CCAGTCTTTACTGAACAGCGGCACCAGAAAGAACTATTTAGCTTG GTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACT GGGCCAGCATTCGTGAGAGCGGAGTGCCCGACAGATTCAGCGG

		CAGCGGCTCCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCA AGCTGAGGATGTGGCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTT ATACACCTTTGGCCAAGGAACAAAGCTGGAGATCAAA
--	--	---

Los receptores antigénicos quiméricos (CAR) son receptores diseñados genéticamente que pueden dirigir o redirigir células T o células NK (*p. ej.*, células T o NK del paciente o donante) para dirigirse a un antígeno seleccionado. Un CAR puede diseñarse genéticamente para reconocer un antígeno y, cuando se une a ese antígeno, activar la célula inmunitaria para atacar y destruir la célula que posee ese antígeno. Cuando estos antígenos existen en las células tumorales, una célula inmunitaria que expresa el CAR puede dirigirse a y destruir la célula tumoral. Los CAR generalmente comprenden un dominio de unión extracelular que media la unión al antígeno (*p. ej.*, un dominio de unión al GPC3), un dominio transmembrana que abarca, o se entiende que abarca, la membrana celular cuando el CAR está presente en una superficie celular o membrana celular, y un dominio de señalización intracelular (o citoplásmico).

De acuerdo con al menos una vista no limitante, ha habido al menos tres “generaciones” de composiciones del CAR. En una primera generación de CAR, un dominio de unión (*p. ej.*, dominio de unión de fragmento variable monocatenario) se enlaza o conecta a un dominio de señalización (*p. ej.*, CD3 ζ) a través de un dominio transmembrana, que comprende opcionalmente un dominio bisagra y uno o más espaciadores. En una segunda generación de CAR, un dominio coestimulador (CM1, tal como CD28, 4-1BB, u OX-40) se introduce con el dominio de señalización (*p. ej.*, CD3 ζ). Una tercera generación de CAR comprende un segundo dominio coestimulador (CM2).

Los TCR son heterodímeros compuestos por una cadena α y una cadena β . La señalización de TCR requiere el reclutamiento de proteínas de señalización que generan una sinapsis inmunitaria. Además, la localización de TCR en la membrana plasmática depende del complejo CD3, que se expresa en las células T. Pueden generarse TCR monocatenarios diseñados genéticamente, *p. ej.*, usando dominios transmembrana y de señalización de constructos del CAR, métodos y constructos para los cuales se conocen (*p. ej.*, moléculas del CAR y

TCR-CAR, *p. ej.*, fusión de una cadena de TCR β con módulos de señalización CD28 TM y CD28 y CD3 ζ).

Un sistema de unión al GPC3 de la presente descripción puede comprender uno o más dominios de unión al antígeno que se unen al GPC3. En algunas modalidades, un sistema de unión al antígeno comprende además un dominio coestimulador, y/o un dominio extracelular (*p. ej.*, una región “bisagra” o “espaciadora”), y/o un dominio transmembrana, y/o un dominio intracelular (de señalización), y/o un dominio de activación de CD3-zeta o CD3- ϵ . En algunas modalidades, un sistema de unión al GPC3 de la presente descripción comprende al menos un dominio de unión que se une al GPC3 humano, un dominio coestimulador, un dominio extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio de activación de CD3-zeta o CD3- ϵ .

En algunas modalidades, un CAR de unión al GPC3 de la presente descripción puede comprender un sistema de unión al antígeno que comprende uno o más, o todos, de un péptido líder (P), unión al GPC3 (B), un dominio extracelular de proteína coestimuladora (E), un dominio transmembrana (T), un dominio coestimulador (C), un segundo dominio coestimulador (C'), y un dominio de activación (A). En algunos casos, un CAR de unión al GPC3 se configura de acuerdo con lo siguiente: B E T A. En algunos casos, un CAR de unión al GPC3 se configura de acuerdo con lo siguiente: P B E T A. En algunos casos, un CAR de unión al GPC3 se configura de acuerdo con lo siguiente: B E T C A. En algunos casos un CAR de unión al GPC3 se configura de acuerdo con lo siguiente: P B E T C A. En algunos casos, un CAR de unión al GPC3 se configura de acuerdo con lo siguiente: B E T C C' A. En algunos casos, un CAR de unión al GPC3 se configura de acuerdo con lo siguiente: P B E T C C' A. En algunas modalidades, un CAR de unión al GPC3 comprende una VH y una VL, opcionalmente en donde el CAR está configurado de acuerdo con lo siguiente: P-VH-VL-E-T-C-A o P-VL-VH-E-T-C-A. En algunas modalidades, la VH y la VL se conectan mediante un enlazador (L), opcionalmente en donde el CAR se configura de acuerdo con lo

siguiente, desde el extremo N al extremo C: P-VH-L-VL-E-T-C-A o P-VH-L-VL-E-T-C-A.

Uno o más dominios de unión al antígeno determinan la(s) diana(s) de un sistema de unión al antígeno. Un dominio de unión de un sistema de unión al antígeno puede comprender cualquier dominio de unión al GPC3, *p. ej.*, un anticuerpo proporcionado por la presente descripción, *p. ej.*, un dominio de unión de la presente descripción. El dominio de unión se usa en receptores de antígenos quiméricos al menos en parte porque pueden diseñarse genéticamente para expresarse como parte de una única cadena junto con los otros componentes del CAR. Ver, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. núms. 7.741.465, y 6.319.494 así como Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136, Krause et al., *J. Exp. Med.*, vol. 188, núm. 4, 1998 (619-626); Finney et al., *Journal of Immunology*, 1998, 161: 2791-2797, cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción por referencia con respecto a los dominios de unión en CAR. Un dominio de unión o scFv es un fragmento de unión al antígeno monocatenario que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, cuyo dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera se enlazan o conectan entre sí. Ver, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. núms. 7.741.465, y 6.319.494 así como Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136, cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia con respecto a los dominios del dominio de unión. Cuando se deriva de un anticuerpo parental, un dominio de unión puede retener parte de, retener la totalidad de, o esencialmente retener la unión del anticuerpo parental de un antígeno diana. En algunas modalidades, un CAR contemplado en la presente descripción comprende un dominio de unión específico del antígeno que puede ser un scFv (un scFv murino, humano o humanizado) que se une a un antígeno expresado en una célula cancerosa. En una cierta modalidad, el scFv se une al GPC3.

En ciertas modalidades, los CAR contemplados en la presente descripción pueden comprender residuos del enlazador entre los diversos dominios, *p. ej.*, entre los

dominios VH y VL, añadidos para la conformación de espaciado adecuado de la molécula. Los CAR contemplados en la presente descripción pueden comprender uno, dos, tres, cuatro, o cinco o más enlazadores. En algunas modalidades, la longitud de un enlazador es de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 aminoácidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos, o cualquier longitud intermedia de aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más aminoácidos.

Los ejemplos ilustrativos de enlazadores incluyen polímeros de glicina (G)_n; polímeros de glicina-serina (G₁₋₅S₁₋₅)_n, donde n es un entero de al menos uno, dos, tres, cuatro, o cinco; polímeros de glicina-alanina; polímeros de alanina-serina; y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina son relativamente no estructurados y, por lo tanto, pueden ser capaces de servir como una atadura neutra entre los dominios de las proteínas de fusión, tales como los CAR descritos en la presente descripción. La glicina accede a más espacio phi-psi que incluso la alanina, y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (ver Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173–142 (1992)). Otros enlazadores contemplados en la presente descripción incluyen enlazadores Whitlow (ver Whitlow, *Protein Eng.* 6(8): 989–95 (1993)). El experto en la técnica reconocerá que el diseño de un CAR en algunas modalidades puede incluir enlazadores que son completa o parcialmente flexibles, de tal manera que el enlazador puede incluir un enlazador flexible así como una o más porciones que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura del CAR deseada. En una modalidad, cualquiera de los constructos descritos en la presente descripción puede comprender un enlazador “GS”. En otra modalidad, cualquiera de los constructos descritos en el presente documento comprende un enlazador “GSG”. En un ejemplo, un enlazador de glicina-serina comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GS (sec. con núm. de ident.: 51), que puede ser codificada por la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con

GGATCC (sec. con núm. de ident.: 52) o GGGTCC (sec. con núm. de ident.: 53). En un ejemplo, un enlazador de glicina-serina comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GSG (sec. con núm. de ident.: 54), que puede ser codificada por la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con GGCTCTGGA (sec. con núm. de ident.: 55) o gggtcc (sec. con núm. de ident.: 56). En un ejemplo, un enlazador de glicina-serina comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GGGSGGGS (sec. con núm. de ident.: 56), que puede ser codificada por la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con GGCGGTGGAAGCGGAGGAGGTTCC (sec. con núm. de ident.: 58). En otra modalidad, los CAR descritos en la presente descripción comprenden la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 59 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG (sec. con núm. de ident.: 59). En una modalidad, un enlazador está codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con GGATCCACATCCGGCAGCGGAAAGCCCGGTAGCGGCGAGGGCAGCACCAA AGGA (sec. con núm. de ident.: 60), GGCTCCACAAGCGGATCCGGCAAACCCGGTAGCGGCGAAGGCAGCACCAA GGGC (sec. con núm. de ident.: 61), o GGAAGCACCTCCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAGCGGCGAAGGATCCACCAA GGGC (sec. con núm. de ident.: 62) GGATCCACCAGCGGATCCGGCAAGCCCGGTAGCGGAGAAGGCAGCACCAA GGGC (sec. con núm. de ident.: 63) GGCAGCACAAGCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAGCGGCGAGGGAAGCACCAA GGGC (sec. con núm. de ident.: 64).

En las modalidades, un CAR comprende un scFv que comprende además una secuencia de enlace de la región variable. Una “secuencia de enlace de región variable” es una secuencia de aminoácidos que conecta una región variable de cadena pesada a una región variable de cadena liviana y proporciona una función espaciadora compatible con la interacción de los dos subdominios de unión de tal manera que el polipéptido resultante retiene una afinidad de unión específica a la misma molécula diana que un anticuerpo que comprende las mismas regiones variables de cadena liviana y pesada. En una modalidad, la secuencia de enlace de región variable tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más aminoácidos.

En las modalidades, el dominio de unión del CAR está seguido por uno o más “dominios espaciadores”, que se refiere a la región que mueve el dominio de unión al antígeno lejos de la superficie de la célula efectora para permitir el contacto célula/célula, unión y activación del antígeno adecuados (Patel *et al.*, *Gene Therapy*, 1999; 6: 412–419). El dominio espaciador puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética, o recombinante. En ciertas modalidades, un dominio espaciador es una porción de una inmunoglobulina, que incluye, pero no se limita a, una o más regiones constantes de cadena pesada, *p. ej.* CH2 y CH3. El dominio espaciador puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

El dominio de unión del CAR puede estar seguido generalmente por uno o más “dominios bisagra”, que desempeña una función en la ubicación del dominio de unión al antígeno lejos de la superficie de la célula efectora para permitir el contacto célula/célula, unión y activación del antígeno adecuados. Un CAR generalmente comprende uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio transmembrana. El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética, o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de

aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

En algunas modalidades, un sistema de unión al antígeno de la presente descripción puede comprender una bisagra que es, proviene de, o se deriva de (*p. ej.*, comprende todo o un fragmento de) un dominio bisagra similar a la inmunoglobulina. En algunas modalidades, un dominio bisagra proviene o se deriva de una inmunoglobulina. En algunas modalidades, se selecciona un dominio bisagra de la bisagra de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, o IgM, o un fragmento de estas. Una bisagra puede derivarse de una fuente natural o de una fuente sintética. Los dominios bisagra adecuados para su uso en los CAR descritos en la presente descripción incluyen la región bisagra derivada de las regiones extracelulares de proteínas de membrana tipo 1 tales como CD8 α , CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones bisagra de silvestre de estas moléculas o pueden estar alteradas, por ejemplo, un dominio bisagra de CD28 truncado. Una bisagra puede derivarse de una fuente natural o de una fuente sintética. En algunas modalidades, un sistema de unión al antígeno de la presente descripción puede comprender una bisagra que es, proviene de, o se deriva de (*p.ej.*, comprende la totalidad o un fragmento de) CD2, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD4, CD7, CD8 α , CD8 β , CD11a (ITGAL), CD11b (ITGAM), CD11c (ITGAX), CD11d (ITGAD), CD18 (ITGB2), CD19 (B4), CD27 (TNFRSF7), CD28, CD28T, CD29 (ITGB1), CD30 (TNFRSF8), CD40 (TNFRSF5), CD48 (SLAMF2), CD49a (ITGA1), CD49d (ITGA4), CD49f (ITGA6), CD66a (CEACAM1), CD66b (CEACAM8), CD66c (CEACAM6), CD66d (CEACAM3), CD66e (CEACAM5), CD69 (CLEC2), CD79A (cadena alfa asociada al complejo de receptores de antígeno de células B), CD79B (cadena beta asociada al complejo de receptores de antígeno de células B), CD84 (SLAMF5), CD96 (Tactile), CD100 (SEMA4D), CD103 (ITGAE), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD158A (KIR2DL1), CD158B1 (KIR2DL2), CD158B2 (KIR2DL3), CD158C (KIR3DP1), CD158D (KIR2DL4), CD158F1 (KIR2DL5A), CD158F2 (KIR2DL5B), CD158K (KIR3DL2), CD160 (BY55), CD162 (SELPLG), CD226 (DNAM1), CD229 (SLAMF3), CD244 (SLAMF4), CD247 (CD3-zeta), CD258 (LIGHT), CD268 (BAFFR),

CD270 (TNFSF14), CD272 (BTLA), CD276 (B7-H3), CD279 (PD-1), CD314 (NKG2D), CD319 (SLAMF7), CD335 (NK-p46), CD336 (NK-p44), CD337 (NK-p30), CD352 (SLAMF6), CD353 (SLAMF8), CD355 (CRTAM), CD357 (TNFRSF18), coestimulador de células T inducible (ICOS), LFA-1 (CD11a/CD18), NKG2C, DAP-10, ICAM-1, NKp80 (KLRP1), IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, LFA1-1, SLAMF9, LAT, GADS (GrpL), SLP-76 (LCP2), PAG1/CBP, un ligando CD83, receptor Fc gamma, molécula de clase 1 de MHC, molécula de clase 2 de MHC, una proteína del receptor del TNF, una proteína de inmunoglobulina, un receptor de citocinas, una integrina, receptores de células NK activadoras, o receptor Toll del ligando, o que es un fragmento o combinación de estos.

En las modalidades, el dominio bisagra comprende una región bisagra CD8 α . En las modalidades, los CAR descritos en la presente descripción comprenden un dominio bisagra CD8 α que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95-100 %) la sec. con núm. de ident.: 65 (TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (sec. con núm. de ident.: 65)). En las modalidades, el dominio bisagra de CD8 α está codificado por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95-100 %) con el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con: ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTC GCAACCCCTGTCCCTGCGCCCCGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCG CAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (sec. con núm. de ident.: 66).

En las modalidades, el dominio bisagra comprende una región bisagra de la región bisagra CD28 truncada (CD28T), tal como se describe en la solicitud de patente internacional núm.: PCT/US2017/025351, presentada el 31 de marzo de 2017,

que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. En las modalidades, los CAR descritos en la presente descripción comprenden un dominio bisagra CD28T que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 67 (LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP (sec. con núm. de ident.: 67)). En las modalidades, un dominio bisagra CD28T está codificado por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) con el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con CTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACC TTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCC (sec. con núm. de ident.: 68).

Se conocen secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de estos dominios bisagra. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica un dominio bisagra comprende una secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % (*p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %) idéntica a una secuencia de nucleótidos conocida. En algunas modalidades, la secuencia de polipéptidos de un dominio bisagra comprende una secuencia de polipéptidos al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos

aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % (p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %) idéntica a una secuencia de polipéptidos conocida.

En general, un “dominio transmembrana” (p. ej., de un sistema de unión al antígeno) se refiere a un dominio que tiene un atributo de estar presente en la membrana cuando está presente en una molécula en una superficie celular o membrana celular (*p. ej.*, que abarca una porción o la totalidad de una membrana celular). Un dominio coestimulador para un sistema de unión al antígeno de la presente descripción puede comprender además un dominio transmembrana y/o un dominio de señalización intracelular. No se requiere la presencia de cada aminoácido en un dominio transmembrana en la membrana. Por ejemplo, en algunas modalidades, un dominio transmembrana se caracteriza porque un estiramiento designado o porción de una proteína está sustancialmente ubicada en la membrana. Las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se pueden analizar usando una variedad de algoritmos para predecir la localización subcelular de proteínas (*p. ej.* la localización transmembrana). Los programas psort (PSORT.org) y Prosite (prosite.expasy.org) son ejemplos de tales programas.

El tipo de dominio transmembrana comprendido en un sistema de unión al antígeno descrito en la presente descripción no se limita a ningún tipo. En algunas modalidades, se selecciona un dominio transmembrana que está asociado naturalmente con un dominio de unión y/o dominio intracelular. En algunos casos, un dominio transmembrana comprende una modificación de uno o más aminoácidos (*p. ej.*, delección, inserción, y/o sustitución), *p. ej.*, para evitar la unión de tales dominios a un dominio transmembrana de las mismas proteínas de membrana superficial o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

Un dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, un dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Los dominios transmembrana ilustrativos pueden derivarse de (*p. ej.*, puede comprender al menos un dominio transmembrana de) una cadena alfa, beta o zeta de un receptor de células T, 2B4, CD28, CD3 épsilon, CD3 delta, CD3 gamma, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD8 alfa, CD8 beta, CD9, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD16, CD22, CD27, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, TNFSFR25, CD154, 4-1BB/CD137, receptor de células NK activadoras, una proteína de inmunoglobulina, B7-H3, BAFRR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD100 (SEMA4D), CD103, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD247, CD276 (B7-H3), CD29, CD30, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD84, CD96 (Tactile), CDS, CEACAM1, CRT AM, receptor de citocina, DAP-10, DAP-12, DNAM1 (CD226), receptor de Fc gamma, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, Ig alfa (CD79a), IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, coestimulador de células T inducible (ICOS), integrinas, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, un ligando que se une con CD83, LIGHT, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), antígeno asociado a la función linfocitaria 1 (LFA-1; CD1-1a/CD18), molécula de clase 1 de MHC, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, muerte programada 1 (PD-1), PSGL1, SELPLG (CD162), moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Ly108), SLAMF7, SLP-76, proteínas del receptor del TNF, TNFR2, TNFSF14, un receptor Toll del ligando, TRANCE/RANKL, VLA1, o VLA-6, o un fragmento, truncamiento o una combinación de estos. En algunas modalidades, un dominio transmembrana puede ser sintético (y puede, *p. ej.*, comprender predominantemente residuos hidrófobos tales como leucina y valina). En algunas modalidades, un dominio transmembrana sintético comprende un triplete de fenilalanina, triptófano y valina está comprendido en cada extremo. En algunas modalidades, un dominio transmembrana está directamente enlazado o conectado a un dominio citoplásmico. En algunas

modalidades, un oligo- corto o polipéptido enlazador (*p. ej.*, entre 2 y 10 aminoácidos de longitud) puede formar un enlace entre un dominio transmembrana y un dominio intracelular. En algunas modalidades, un enlazador es un doblete de glicina-serina.

En las modalidades los CAR descritos en la presente descripción comprenden un dominio TM de CD8 α que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 69 (IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (sec. con núm. de ident.: 69)). En las modalidades, un dominio TM de CD8 α se codifica por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCA CTGGTTATCACCCCTTTAtTGC (sec. con núm. de ident.: 70).

En las modalidades los CAR descritos en la presente descripción comprenden un dominio TM de CD28 que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 71 (FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (sec. con núm. de ident.: 71)). En las modalidades, un dominio TM de CD28 se codifica por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT AACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG (sec. con núm. de ident.: 72).

Se conocen las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de los dominios transmembrana proporcionados en la presente descripción. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica un dominio transmembrana comprende una secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % (p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %) idéntica a una secuencia de nucleótidos conocida. En algunas modalidades, la secuencia de polipéptidos de un dominio transmembrana comprende una secuencia de polipéptidos al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % (p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %) idéntica a una secuencia de polipéptidos conocida. Opcionalmente, los espaciadores cortos pueden formar enlaces entre cualquiera o algunos de los dominios extracelulares, transmembrana e intracelulares del CAR.

Se conocen dominios de señalización intracelular que pueden transducir una señal ante la unión de un antígeno a una célula inmunitaria, cualquiera de los cuales puede estar comprendido en un sistema de unión al antígeno de la presente descripción. Por ejemplo, se sabe que las secuencias citoplasmáticas de un receptor de células T (TCR) inician la transducción de señales después de la unión de TCR a un antígeno (ver, *p. ej.*, Brownlie et al., *Nature Rev. Immunol.* 13:257-269 (2013)).

En algunas modalidades, los CAR contemplados en la presente descripción comprenden un dominio de señalización intracelular. Un “dominio de señalización intracelular” se refiere a la parte de un CAR que participa en la transducción del mensaje de unión efectivo del CAR a un antígeno diana en el interior de la célula efectora inmunitaria para provocar la función de células efectoras, p. ej., la activación, producción de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, que incluye la liberación de factores citotóxicos a la célula diana unida al CAR u otras respuestas celulares producidas con la unión del antígeno al dominio del CAR extracelular. En algunas modalidades, un dominio de señalización y/o dominio de activación comprende un dominio de activación inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas comprenden aquellos derivados de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 zeta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, y CD66d (ver, *p. ej.*, Love et al., Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:a002485 (2010); Smith-Garvin et al., Annu. Rev. Immunol. 27:591-619 (2009)). En algunas modalidades, los dominios de señalización adecuados comprenden, sin limitarse a, 4-1BB/CD137, receptores de células NK activadoras, una proteína de inmunoglobulina, B7-H3, BAFFR, BAME (SLAMF8), BTLA, CD100 (SEMA4D), CD103, CD160(BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD247, CD27, CD276 (B7-H3), CD28, CD29, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD30, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD7, CD84, CD8 alfa, CD8 beta, CD96 (táctil), CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDS, CEACAM1, CRT AM, receptor de citocina, DAP-10, DNAM1 (CD226), receptor Fc gamma, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, Ig alfa (CD79a), IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, coestimulador de células T inducible (ICOS), integrinas, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, ligando que se une con CD83, LIGHT, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), Ly108), antígeno asociado a la función linfocitaria 1 (LFA-1; CD1-1a/CD18), molécula de clase 1 de MHC, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, muerte programada 1 (PD-1), PSGL1, SELPLG

(CD162), moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A, SLAMF7, SLP-76, proteínas del receptor del TNF, TNFR2, TNFSF14, un receptor Toll del ligando, TRANCE/RANKL, VLA1 o VLA-6, o un fragmento, truncamiento o una combinación de estos.

El término “función efectora” se refiere a una función especializada de la célula. La función efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o ayuda o actividad que incluye la secreción de una citocina. Por lo tanto, el término “dominio de señalización intracelular” se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y que dirige la célula para que realice una función especializada. Si bien usualmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos, no es necesario usar el dominio completo. En la medida en que se use una porción truncada de un dominio de señalización intracelular, tal porción truncada puede usarse en lugar del dominio completo siempre que se transduzca la señal de la función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa de la célula T y que también puede requerirse una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, puede decirse que la activación de células T está mediada por dos clases distintas de dominios de señalización intracelular: dominios de señalización primaria que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (p. ej., un complejo TCR/CD3) y dominios de señalización coestimuladores que actúan de una manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora. En algunas modalidades, un CAR contemplado en la presente descripción comprende un dominio de señalización intracelular que comprende uno o más “dominios de señalización coestimuladores” y un “dominio de señalización primario”

Los ejemplos ilustrativos de los dominios de señalización primarios que contienen ITAM que son útiles en la presente descripción incluyen los que se derivan de TCR ζ , FcR γ , FcR β , DAP12, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, y CD66d. En algunas modalidades, un CAR comprende un dominio de señalización primario CD3 ζ y uno o más dominios de señalización coestimuladores. La señalización primaria intracelular y los dominios de señalización coestimuladores pueden estar enlazados en cualquier orden en tándem al extremo carboxilo del dominio transmembrana. En una modalidad, los CAR tienen un dominio CD3 ζ que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 73. LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR (sec. con núm. de ident.: 73). En las modalidades, un dominio CD3 ζ está codificado por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con: ttgAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCcTAAtCAGCAaGGCCA GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATtTAGGgCGAAGAGAGGAGTACGATGTT TTGGACAAGAGgCGTGGCCGGGACCCcGAaATGGGGGGAAAGCCGAGAAG GAAGAACCCTCAGGAAGGCtTGTAACAATGAAtTGCAGAAgGATAAGATGGCG GAGGCaTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG GCACGATGGCCTTTAtCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC GCCCTTCACATGCAaGCCCTGCCCCCTCGC (sec. con núm. de ident.: 74).

Los CAR contemplados en la presente descripción comprenden uno o más dominios de señalización coestimuladores para potenciarla eficacia y la expansión de células T que expresan receptores CAR. Como se usa en la presente descripción, el término

“dominio de señalización coestimulador” o “dominio coestimulador” se refiere a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora. En algunas modalidades, las moléculas coestimuladoras pueden incluir DAP-10, DAP-12, CD27, CD28, CD137(4-IBB), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-I, ICOS (CD278), CTLA4, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, TRIM, LCK3, SLAM, DAPIO, LAG3, HVEM, B7-H3, NKD2C, GITR, CD5, ICAM-I, CDI Ia, Lck, TNFR-I, TNFR-II, FasR, NKG2C, y B7-H3, y CD83.

En las modalidades, los CAR comprenden un dominio coestimulador de 4-IBB que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 75. RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE (sec. con núm. de ident.: 75). En las modalidades, un dominio coestimulador 4-IBB está codificado por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) con el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con: (sec. con núm. de ident.:

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACC
AGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAAGAA
GAAGAAGGAGGATGTGAA (sec. con núm. de ident.: 76).

En las modalidades, los CAR comprenden un dominio coestimulador de CD28 que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) sec. con núm. de ident.: 77. RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (sec. con núm. de ident.: 77). En las modalidades, un dominio coestimulador CD28 está codificado por

un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) con el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con, que puede ser codificada por la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCC GCCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG ACTTCGCAGCCTATCGCTCC (sec. con núm. de ident.: 78).

Los CAR diseñados genéticamente descritos en la presente descripción también pueden comprender un péptido señal o etiqueta del terminal N en el terminal N del scFv o dominio de unión al antígeno. En una modalidad, puede usarse un péptido señal heterólogo. El dominio de unión al antígeno o scFV puede fusionarse a un líder o un péptido de señal que dirige la proteína naciente al retículo endoplásmico y posterior translocación a la superficie celular. Se entiende que, una vez que un polipéptido que contiene un péptido señal se expresa en la superficie celular, generalmente el péptido señal se elimina proteolíticamente durante el procesamiento del polipéptido en el retículo endoplásmico y la translocación a la superficie celular. Por lo tanto, un polipéptido tal como los constructos del CAR descritos en la presente descripción generalmente se expresan en la superficie celular como una proteína madura que carece del péptido señal, mientras que la forma precursora del polipéptido incluye el péptido señal. Puede usarse cualquier secuencia de señal adecuada conocida en la técnica. Similarmente, puede usarse además cualquier secuencia de etiqueta conocida en la materia. En una modalidad, una secuencia señal es una secuencia señal CSF2RA. En las modalidades, los CAR descritos en la presente descripción comprenden una secuencia señal CSF2RA que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. de ident.: MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (sec. con núm. de ident.: 79)

MEWTWVFLFLSVTAGVHS (sec. con núm. de ident.: 80), o MALPVTALLLPLALLLHAARP (sec. con núm. de ident.: 81).

Los componentes de un CAR pueden intercambiarse o “alternarse” usando técnicas de rutina de biotecnología para componentes equivalentes. Para proporcionar solo unos pocos ejemplos no limitantes y parciales, un CAR de la presente descripción puede comprender un dominio de unión como se proporciona en la presente descripción en combinación con una bisagra proporcionada en la presente descripción y un dominio coestimulador proporcionado en la presente descripción. En ciertos ejemplos, un CAR de la presente descripción puede comprender una secuencia líder como se proporciona en la presente descripción junto con un dominio de unión como se proporciona en la presente descripción en combinación con una bisagra proporcionada en la presente descripción y un dominio coestimulador proporcionado en la presente descripción.

La presente descripción comprende conjugados en los que un anticuerpo de la presente descripción está asociado con un agente terapéutico o una entidad detectable. En diversas modalidades, el agente terapéutico es un agente anticancerígeno como se proporciona en la presente. En ciertas modalidades, el conjugado proporcionado comprende una o más entidades detectables, es decir, está “etiquetado” con una o más de tales entidades. En algunas de tales modalidades, un conjugado de la presente descripción es útil en aplicaciones de diagnóstico u obtención de imágenes, *p. ej.*, diagnosticar u obtener imágenes del cáncer. Se puede usar cualquiera de una amplia variedad de entidades detectables en conjugados de anticuerpo etiquetados descritos en la presente descripción. Las entidades detectables adecuadas comprenden, sin limitarse a: varios ligandos, radionúclidos; colorantes fluorescentes; agentes quimioluminiscentes (tales como, por ejemplo, ésteres de acridinio, dioxetanos estabilizados, y lo similar); agentes bioluminiscentes; nanocristales semiconductores fluorescentes inorgánicos de resolubles espectralmente (es decir, puntos cuánticos); micropartículas; nanopartículas metálicas (*p. ej.*, oro, plata, cobre, platino, etc.); nanoconglomerados; iones metálicos

paramagnéticos; enzimas; etiquetas colorimétricas (tales como, por ejemplo, colorantes, oro coloidal, y lo similar); biotina; dioxigenina; haptenos; y proteínas para las cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

La presente descripción comprende ácidos nucleicos que codifican dominios de unión al GPC3 proporcionados en la presente descripción. La presente descripción comprende ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de los proporcionados en la presente descripción, que comprenden, sin limitarse a, ácidos nucleicos que codifican dominios de unión al GPC3. La presente descripción comprende ácidos nucleicos que codifican sistemas de unión al antígeno proporcionados en la presente descripción, que comprenden, sin limitarse a, ácidos nucleicos que codifican receptores de antígenos quiméricos de unión al GPC3. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 4 comprende y proporciona secuencias de ácido nucleico ilustrativas que corresponden a y codifican cada una de las sec. con núms. de ident.: 3 y 5-13. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 15 comprende y proporciona secuencias de ácido nucleico ilustrativas que corresponden a y codifican cada una de las sec. con núms. de ident.: 12 y 16-24. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 26 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 25. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 28 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 27. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 30 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 29. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 32 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 31. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 34 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 33. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 36 comprende y

proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 35. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 38 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 37. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 40 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 39. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 42 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 41. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 44 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 43. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 46 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 45. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 48 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 47. La secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 50 comprende y proporciona una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que corresponde a y codifica la sec. con núm. de ident.: 49.

En una modalidad descrita en la presente descripción, un constructo CAR de unión al GPC3 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 82.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYP
GSGNTYYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWF
VYWGQGTLVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATIN
CKSSQSLLNSGTRKKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGT
DFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGTKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIAS

QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG
 RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (sec. con
 núm. de ident.: 82). En las modalidades, un CAR de unión al GPC3 es codificado
 por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal
 como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de
 identidad; p. ej., 85-90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95–100 %) con
 el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con:

CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCCGGCGCCAGC
 GTGAAAGTCTCATGCAAGGCCAGCGGCTATACCTTCACCGACTACTACATCC
 ACTGGGTCCGACAAGCTCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCT
 ACCCCGGCAGCGGCAACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGTGA
 CCATGACTCGTGACACCTCCACCTCCACCGTGTATATGGAGCTGAGCTCTTT
 AAGGTCCGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGAGGAAACGACTACGA
 CGCTTGTTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTCAGCTCCGG
 CTCCACAAGCGGATCCGGCAAACCCGGTAGCGGCGAAGGCAGCACCAAGG
 GCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCTGTGTCTTTAGGCGA
 GAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGAGCTTATTAATAGCGGCACT
 CGAAAAAACTATTTAGCTTGTTACCAACAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGC
 TGCTCATCTACTGGGCTTCCATCAGAGAGAGCGGCGTGCCCGATAGATTTCAG
 CGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACTTTAACCATCTCCTCTTTACAAGCT
 GAGGACGTGGCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCG
 GCCAAGGAACAAAGCTGGAGATCAAaggGtccACCACGACGCCAGCGCCGCG
 ACCACCAACACCGGCGCCCAACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCC
 AGAGGCGTGCCGGCCAgcggcggggggagcagTGCACACGAGGGGGCTGGACTT
 CGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTT
 CTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCT
 GTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG

ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAG
 AGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA
 CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
 GACAAGAGgCGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAA
 GAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGA
 GGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGC
 ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
 CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (sec. con núm. de ident.: 83).

En una modalidad descrita en la presente descripción, un constructo CAR de unión al GPC3 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 84.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYP
 GSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGNDYDAWF
 VYWGQGT LTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
 KSSQSLLNSGTRKNYLAWYQQKPGQP PKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDF
 TLTISSLQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQG TKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL
 SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL
 LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQ
 LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
 EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (sec. con núm. de
 ident.: 84). En las modalidades, un CAR de unión al GPC3 es codificado por un ácido
 nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos
 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*,
 85-90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95–100 %) con el ácido
 nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con:
 CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCCGGCGCCAGC
 GTGAAAGTCTCATGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCCA

CTGGGTCCGACAAGCTCCCGGCCAAGGTCTGGAGTGGATGGGCGAGATCTA
 CCCC GGCTCCGGCAACACCTATTACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGTGACC
 ATGACAGCCGACACCTCCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGGAGAGCTTAC
 GTAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTCGTGGCAACGACTACGACGC
 TTGGTTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACTCTGGTGACCGTGTCTCCGGAAGC
 ACCTCCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAGCGGCGAAGGATCCACCAAGGGCGAC
 ATCGTGATGACCCAGTCCCCCGATTCTTTAGCCGTCAGCCTTGGAGAGAGAG
 CCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCTTATTAACTCCGGCACTCGAAAA
 AACTACCTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGTCAGCCCCCTAAGCTGCTGA
 TCTACTGGGCCAGCATTTCGTGAGAGCGGAGTGCCCGACAGATTTAGCGGCTC
 CGGCAGCGGCACCGATTTCACTTTAACCATCAGCTCTTTACAAGCTGAGGATG
 TGGCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGA
 ACAAAGCTGGAGATTAAGggGtccACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAAC
 ACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTG
 CCGGCCAgcggcgggggggcgagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
 ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACT
 GGTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA
 ACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT
 GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAG
 CAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAA
 CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGgCGT
 GGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA
 GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGA
 TTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC
 AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGC
 CCTGCCCCCTCGC (sec. con núm. de ident.:85).

En una modalidad descrita en la presente descripción, un constructo CAR de unión al GPC3 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al

menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 86.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYP
 GSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWF
 VYWGQGTLLTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMN
 CKSSQSLLNSGTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGT
 DFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGTKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIAS
 QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRG
 RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (sec. con
 núm. de ident.: 86). En las modalidades, un CAR de unión al GPC3 es codificado
 por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal
 como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de
 identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95–100 %) con
 el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con:

CAAGTTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCCGGAGCCAGC
 GTGAAAGTCTCATGTAAAACCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCCA
 CTGGGTCCGACAAGCCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCTA
 CCCCCGGCTCCGGCAACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCAAGGTCGTGTGAC
 CATGACAGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCTCTG
 CGTTCTGAGGACACAGCCGTTTACTACTGCGCCAGAGGCAACGACTACGAC
 GCTTGTTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTGTCTCTCCGGAT
 CCACATCCGGCAGCGGAAAGCCCGGTAGCGGCGAGGGCAGCACCAAAGGA
 GACATCGTCATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGTCTTTAGGCGAAA
 GAGTGACCATGAACTGCAAGTCCAGCCAGTCTTTACTGAATTCCGGCACTCG
 AAAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTAAGCTG
 CTGATCTACTGGGCTAGCATTCGAGAATCCGGCGTGCCCGATCGCTTTAGCG
 GCAGCGGTAGCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGA

GGACGTGGCTGTGTACTATTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGCC
 AAGGAACAAAGCTGGAGATCAAGggGtccACCACGACGCCAGCGCCGCGACC
 ACCAACACCGGCGCCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCCAGA
 GGCGTGCCGGCCAgcggcggggggcgagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGC
 CTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTC
 CTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTA
 TATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATG
 GCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGT
 GAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACC
 AGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
 CAAGAGgCGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGA
 ACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG
 CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC
 GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCC
 CTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (sec. con núm. de ident.: 87).

En una modalidad descrita en la presente descripción, un constructo CAR de unión al GPC3 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 88.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKTSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWIGEIYPG
 SGNTYYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWFV
 YWGQGTLLTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
 KSSQSLLNSGTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDF
 TLTISSLQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGTKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIASQP
 LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
 LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ
 NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
 AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (sec. con núm.

de ident.: 88). En las modalidades, un CAR de unión al GPC3 es codificado por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; p. ej., 85-90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95–100 %) con el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con:

CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCCCGGTGCCTCC
GTGAAGGTGTCTTGTAAGACCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCC
ACTGGGTCCGACAAGCTCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATTGGCGAGATCTA
TCCCGGCAGCGGCAACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGCCAC
TTTAACCGCTGACACCAGCACCAGCACCGCCTACATGGAGTTCTCCTCTTTAA
GGAGCGAGGACACCGCCGTGTATTACTGCGCTCGTGGCAACGACTATGACG
CTTGGTTCGTGTACTGGGGTCAAGGAACATTAGTGACAGTGAGCAGCGGATC
CACCAGCGGATCCGGCAAGCCCCGGTAGCGGAGAAGGCAGCACCAAGGGCG
ACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCTGTGAGCCTTGGAGAGAG
GGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGTCTTTACTGAACAGCGGCACTCGA
AAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGC
TGATCTACTGGGCCTCCATTCGTGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTCAGCGG
CAGCGGCTCCGGAACCGACTTTACTTTAACCATCTCCTCTTTACAAGCTGAGG
ACGTGGCTGTGTACTACTGCAAGCAGAGCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAA
GGAACAAAGCTGGAAATCAAGggGtccACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAC
CAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGG
CGTGCCGGCCAgcggcggggggagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCT
GTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCT
GTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATA
TATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGC
TGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGA
AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAG
CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACA
AGAGgCGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC

CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA
TGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTT
CACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (sec. con núm. de ident.: 89).

En una modalidad descrita en la presente descripción, un constructo CAR de unión al GPC3 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 90.

VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWIGEIYPGS
GNTYYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWFVYW
GQGTTLTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSS
QSLNSGTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI
SSVQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF
KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (sec. con núm. de ident.:

90). En las modalidades, un CAR de unión al GPC3 es codificado por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) con el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con:

CAAGTTCAGCTGGTCCAGAGCGGCGCTGAAGTGAAGAAGCCCGGCGCTAGC
GTCAAAGTCTCATGCAAAACCTCCGGCTACACCTTTACCGACTACTACATCCA
CTGGGTCCGACAAGCTCCCGGTCAAGGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCTAC
CCCGGCAGCGGCAACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGCCACTT
TAACCGCTGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAAGG
TCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGTGGCAACGATTACGACGCTT

GGTTCGTGTACTGGGGACAAGGAACATTAGTGACCGTGTCCAGCGGCAGCAC
AAGCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAGCGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCGATAT
CGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGTCTTTAGGAGAGAGAGTG
ACCATGAACTGCAAGAGCAGCCAGTCTTTACTGAACAGCGGCACCAGAAAGA
ACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGAT
CTACTGGGCCAGCATTTCGTGAGAGCGGAGTGCCCGACAGATTCAGCGGCAG
CGGCTCCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGAGGAT
GTGGCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTTGGCCAAGG
AACAAAGCTGGAGATCAAaggGtccACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA
CACCGGCGCCCAACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGT
GCCGGCCAgcgggcgggggcgagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
TATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC
TGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCA
AACAAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGC
TGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCA
GCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA
ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGgCGT
GGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA
GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGA
TTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC
AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGC
CCTGCCCCCTCGC (sec. con núm. de ident.: 91).

Ambos receptores de células T (TCR) diseñados genéticamente y terapias con receptor del antígeno quimérico (CAR) cumplen la especificidad y el efecto inmunoterapéutico de las células T para el tratamiento de una amplia variedad de neoplasias malignas. Algunos estudios sugieren que estas terapias pueden ser susceptibles a los factores supresores en el TME que resultan de la supresión de células T mediante TGF- β (Bendle et al., J Immunol, 191:3232–3239 (2013) y Vong et al., Blood, 130:1791 (2017)). La presente descripción contempla el uso de los

receptores de DN TGF- β descritos en la presente descripción en combinación con terapias de TCR o CAR como una manera de mantener, o en algunos casos, restaurar el TCR y/o la expansión del CAR en presencia de la supresión de TGF- β .

La terapia con células T del receptor de antígeno quimérico (CAR) proporciona otro enfoque terapéutico contra la progresión tumoral. Clínicamente, los investigadores han demostrado que la expansión y la persistencia del CAR se correlaciona con la eficacia terapéutica. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que las poblaciones de células T con TGF- β reprimido encontradas en el TME pueden limitar la expansión de las células T CAR y la persistencia en pacientes que no responden a la terapia con CAR. Se cree que las citocinas inhibitoras resultantes en el TME limitan la función y la expansión de las células del CAR. Por lo tanto, el TGF- β podría limitar la eficacia de células T terapéuticas diseñadas genéticamente.

La combinación de cualquier constructo de CAR o TCR como se describe en la presente descripción con los receptores DN TGF- β puede restaurar, mantener o potenciar el efecto terapéutico de la exposición a la terapia con T CAR por supresión de TGF- β . Por lo tanto, en una modalidad describe en la presente descripción, los receptores DN TGF- β , por ejemplo, DN TGF- β RI o RII, se coexpresan en una célula T o una célula NK con un CAR de unión al GPC3, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los receptores DN TGF- β , por ejemplo, DN TGF- β RI o RII, se coexpresan en una célula T o célula NK con un CAR de unión al GPC3, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los receptores DN TGF- β , por ejemplo DN TGF- β RI o RII, se coexpresan en una célula T o célula NK con un TCR de unión al GPC3. Los receptores DN TGF- β se describen en la solicitud de patente internacional núm. PCT/US2020/070157, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Los receptores TGF- β diseñados genéticamente pueden comprender un péptido señal del terminal N en el terminal N, por ejemplo, en el terminal N del dominio extracelular de unión al ligando del DN TGF- β RI. En una modalidad, puede usarse un

péptido señal heterólogo. El dominio extracelular de un DN TGF- β RI puede fusionarse a un líder o un péptido de señal que dirige la proteína naciente al retículo endoplásmico y posterior translocación a la superficie celular. Se entiende que, una vez que un polipéptido que contiene un péptido señal se expresa en la superficie celular, generalmente el péptido señal se elimina proteolíticamente durante el procesamiento del polipéptido en el retículo endoplásmico y la translocación a la superficie celular. Por lo tanto, un polipéptido tal como un DN TGF- β RI generalmente se expresan en la superficie celular como una proteína madura que carece del péptido señal, mientras que la forma precursora del polipéptido incluye el péptido señal. Se puede usar cualquier secuencia señal adecuada. En una modalidad descrita en la presente descripción, el DN TGF- β RI comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 92 o una porción de esta. MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAALLPGATA (sec. con núm. de ident.: 92).

En la presente descripción, el péptido señal se une al extremo N del dominio de unión al antígeno extracelular del DN TGF- β RI como una proteína de fusión. En una modalidad, el DN TGF- β RI comprende un dominio de unión al ligando extracelular que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) del TGF- β RI de silvestre y un péptido señal en el extremo N del dominio extracelular TGF- β RI, que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 93. MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVTDGLC

FVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCPSSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIE
LPTTVKSSPGLGPVEL (sec. con núm. de ident.: 93).

Los constructos de DN TGF- β RII diseñado genéticamente también pueden comprender un péptido señal del terminal N en el terminal N del dominio de unión al ligando extracelular del TGF- β RII. En una modalidad, puede usarse un péptido señal heterólogo. El dominio extracelular de un DN TGF- β RII puede fusionarse a un líder o un péptido de señal que dirige la proteína naciente al retículo endoplásmico y posterior translocación a la superficie celular. Se entiende que, una vez que un polipéptido que contiene un péptido señal se expresa en la superficie celular, generalmente el péptido señal se elimina proteolíticamente durante el procesamiento del polipéptido en el retículo endoplásmico y la translocación a la superficie celular. Por lo tanto, un polipéptido tal como un DN TGF- β RII generalmente se encuentra en la superficie celular como una proteína madura que carece del péptido señal, mientras que la forma precursora del polipéptido incluye el péptido señal. Se puede usar cualquier secuencia señal adecuada. En una modalidad descrita en la presente descripción, los constructos de DN TGF- β RII descritos en la presente descripción comprenden una secuencia de señal que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 94 o una porción de este. MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIAS (sec. con núm. de ident.: 94). En otra modalidad, la secuencia de señal se deriva de la subunidad alfa del receptor del factor 2 estimulante de colonias (CSF2R α) que comprende la secuencia de aminoácidos de al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 79 o una porción de este. MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP (sec. con núm. de ident.: 79). Las secuencias de

señal descritas en la presente descripción también pueden usarse opcionalmente con cualquier etiqueta de proteína adecuada, que incluye, pero no se limita a: etiqueta V5, etiqueta myc, etiqueta HA, etiqueta de mácula, etiqueta NE. En una modalidad descrita en la presente descripción, la secuencia de señal y etiqueta comprenden la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 95. MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEQKLISEEDL (sec. con núm. de ident.: 95). En las modalidades, la secuencia y la etiqueta señal pueden ser codificadas por una secuencia de ácido nucleico al menos 75 % de identidad de secuencia con ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCAT TCCTCCTGATTCCTGAACAGAAGCTGATAAGTGAGGAGGACTTG (sec. con núm. de ident.: 96) (*p. ej.*, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 % o 95-100 %).

Se entiende que el uso de este péptido señal es ilustrativo. Cualquier péptido señal adecuado, como es bien conocido en la técnica, puede aplicarse al DN TGF- β RI o RII para proporcionar expresión de la superficie celular en una célula inmunitaria. Los péptidos señal útiles pueden derivarse de proteínas de superficie celular expresadas naturalmente en la célula T célula NK o célula precursora de estas, que incluyen cualquiera de los péptidos señal de los polipéptidos descritos en la presente descripción. Por lo tanto, se puede usar cualquier péptido señal adecuado para dirigir la DN TGF- β RI RII para expresarse en la superficie celular de una célula T o célula NK.

En las modalidades, un DN TGF- β RI comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 97.
 MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCF
 VSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVFCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIEL
 PTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPVCFVCISLMLMVYIRVNRQ (sec. con núm. de
 ident.: 97).

En una modalidad, un DN TGF- β RII comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 98:
 MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
 DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPY
 HDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVI
 FQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQ (sec. con núm. de ident.: 98).

En una modalidad, un DN TGF- β RII comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 99.
 TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICE
 KPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFF
 MCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (sec. con núm. de ident.: 99).

En una modalidad descrita en la presente descripción, el DN TGF- β RII comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) el TGF- β RII silvestre como se muestra en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 100.
 TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI

CEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPG
ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYC
Y (sec. con núm. de ident.: 100).

En una modalidad descrita en la presente descripción, el DN TGF- β RII comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 101
TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI
CEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPG
ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSPILLTISILSFFSVALLVIL (sec. con núm. de ident.: 101).

En una modalidad descrita en la presente descripción, el DN TGF- β RII comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) como se muestra en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 102.

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI
CEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPG
ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSPILLTCPTISILSFFSVALLVIL (sec. con núm. de ident.: 102).

T En una modalidad descrita en la presente descripción, el DN TGF- β RII comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) sec. con núm. de ident.: 103.
ACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDI
QARDEVEGFLQDTFPQQLLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSL

TCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQGGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ (sec. con núm. de ident.: 103).

En una modalidad descrita en la presente descripción, el DN TGF- β RII comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad, *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95-100 %) la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 104. TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI CEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPG ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTISILSFFSVALLVILACVLWK KRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEV EGFLQDTPFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGN VSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTL NPVAQGGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ (sec. con núm. de ident.: 104).

En una modalidad descrita en la presente descripción, el DN TGF- β RII comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95-100 %) con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 105. TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI CEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPG ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTCPTISILSFFSVALLVILACVL WKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARD EVEGFLQDTPFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLA GNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGIL TLNPVAQGGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ (sec. con núm. de ident.: 105).

En una modalidad, un DN TGF- β RII diseñado genéticamente comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia

con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 106.
 MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDV
 RFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD
 FILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (sec. con
 núm. de ident.: 106).

En una modalidad, un DN TGF- β RII diseñado genéticamente comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) sec. con núm. de ident.: 107.
 MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEQKLISEEDLTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVK
 FPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETV
 CHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNT
 SNPD (sec. con núm. de ident.: 107).

En una modalidad, un DN TGF- β RII diseñado genéticamente comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. de ident.: 108.
 MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDV
 RFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD
 FILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLT
 ISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPE
 SFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV
 VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLLSL
 GTTNSTLPPPFSLQSGILTLPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNNQ (sec.
 con núm. de ident.: 108).

En una modalidad, un DN TGF- β RII diseñado genéticamente comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. de ident.: 109.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEQKLISEEDLTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF
PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC
HDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSN
PDSPGILLTISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN
LNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSP
NCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVY
QDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQGGQPILTSLSNQEAYVTMSSFYQ
NQ (sec. con núm. de ident.: 109).

En una modalidad, un DN TGF- β RII diseñado genéticamente comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. de ident.: 110.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDV
RFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HDPKLPYHD
FILEDAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSPGILLT
ISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPE
SFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV
VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLLSL
GTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQGGQPILTSLSNQEAYVTMSSFYQ NQ (sec.
con núm. de ident.: 110).

En una modalidad, un DN TGF- β RII diseñado genéticamente comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 %

de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. de ident.: 111.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEQKLISEEDLTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP
QLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
SGPILLTCPTISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN
LNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTPPQQLEESEKQRLGGDVQSPN
CPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQD
LLLSLGTNSTLPPPFSLQSGILTNPVAQGQPILTSLSNQEAYVTMSSFYQNNQ
(sec. con núm. de ident.: 111).

En una modalidad, un DN TGF- β RII diseñado genéticamente comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. de ident.: 112.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDV
RFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD
FILEDAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSPGILLT
CPTISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSF
NPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTPPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPS
EDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLL
LSLGTNSTLPPPFSLQSGILTNPVAQGQPILTSLSNQEAYVTMSSFYQNNQ
(sec. con núm. de ident.: 112).

La presente descripción contempla la expresión de polinucleótidos que codifica los CAR de GPC3, y los TCR descritos en la presente descripción y la coexpresión de polinucleótidos que comprenden los receptores de DN TGF- β diseñados genéticamente con un CAR de unión al GPC3, TCR y fragmentos de estos, células y composiciones que los comprenden, y vectores que expresan polipéptidos.

En una modalidad descrita en la presente descripción, un CAR de unión al GPC3 enlazado a un receptor de DN TGF- β tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 113.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIY
PGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNDYDA
WFVYWGQGTLVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERV
TMNCKSSQSLLNSGTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSG
SGTDFTLTISVQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGKLEIKGSTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP
AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGS
GEGRGSLTTCGDVEENPGPMGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNN
DMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDASPCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSD
ECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCY (sec. con núm.
de ident.: 113). En las modalidades, un CAR de unión al GPC3 es codificado por
un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal
como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 %
de identidad; *p. ej.*, 85-90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95–
100 %) con el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con:
CAAGTCCAAGTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCCGGAGCCAG
CGTGAAAGTCTCATGTAAAACCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATC
CACTGGGTCCGACAAGCCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGAT
CTACCCCGGCTCCGGCAACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCAAGGTCGTGT
GACCATGACAGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGTCCTC

TCTGCGTTCTGAGGACACAGCCGTTTACTACTGCGCCAGAGGCAACGACTA
CGACGCTTGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTGTCTC
CGGATCCACATCCGGCAGCGGAAAGCCCGGTAGCGGCGAGGGCAGCACCA
AAGGAGACATCGTCATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGTCTTTAGG
CGAAAGAGTGACCATGAACTGCAAGTCCAGCCAGTCTTTACTGAATTCCGGC
ACTCGAAAAAATAATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTA
AGCTGCTGATCTACTGGGCTAGCATTGAGAATCCGGCGTGCCCGATCGCT
TTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGC
AAGCTGAGGACGTGGCTGTGTACTATTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACAC
CTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGAGATCAAGGGGTCCACCACGACGCCAG
CGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAACCATCGCGTCGCAACCCCTGTCC
CTGCGCCCCGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACGA
GGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGG
ACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTATTGCAAACGGG
GCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA
ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAA
GGAGGATGTGAATTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC
CTATCAGCAAGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATTTAGGGCGAAG
AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGGCGTGGCCGGGACCCCGAAATGG
GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCTTGTACAATGAATTGC
AGAAGGATAAGATGGCGGAGGCATACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTATCAGGGTCTCAGTACAGC
CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAAGCCCTGCCCCCTCGCGG
CTCTGGAGAGGGCAGAGGCTCTCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAAGAGA
ACCCAGGCCCCATGGGAAGAGGTTTACTGAGAGGACTGTGGCCTTTACACA
TCGTGCTGTGGACTCGTATCGCCAGCACCATCCCCCCCCATGTCCAAAAGA
GCGTGAACAACGACATGATCGTGACCGACAACAATGGCGCCGTGAAGTTCC
CCCAGCTGTGCAAGTTCTGCGACGTGAGGTTTCAGCACTTGTGACAACCAGA
AGAGCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAG

AAGTGTGCGTGGCCGTGTGGAGGAAGAACGACGAGAACATCACTTTAGAGA
 CAGTGTGCCACGACCCCAAGCTGCCCTACCACGACTTCATTTTAGAAGATGC
 CGCCAGCCCCAAGTGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGCGAGACCT
 TCTTCATGTGTTCTTGTTCTGCTGATGAGTGCAACGATAACATCATCTTCAGC
 GAGGAGTACAACACCAGCAACCCCGATTTACTGCTGGTGATCTTCCAAGTTA
 CCGGCATTTCTTTACTGCCTCCGTTGGGCGTGGCTATCAGCGTGATCATCAT
 CTTCTACTGCTAT (sec. con núm. de ident.: 114).

En una modalidad descrita en la presente descripción, un CAR de unión al GPC3
 enlazado a un receptor de DN TGF- β tiene una secuencia de aminoácidos que
 tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al
 menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–
 90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm.
 de ident.: 115.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIY
 PGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNDYDA
 WFVYWGQGT LVT VSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERV
 TMNCKSSQSLLNSGTRK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSG
 SGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGKLEIKGSTTTPAPRPPTPAP
 TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP
 AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGS
 GEGRGSLLTCGDVEENPGPMGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNN
 DMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVAV
 WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSD
 ECNDNIIFSEEYNTSNPDLLL VIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCY (sec. con núm.
 de ident.: 115). En las modalidades, un CAR de unión al GPC3 es codificado por
 un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal
 como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 %

de identidad; p. ej., 85-90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95–100 %) con el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con:

CAAGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCCCGGAGCCAG
CGTGAAAGTCTCATGTAAAACCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATC
CACTGGGTCCGACAAGCCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGAT
CTACCCCGGCTCCGGCAACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCAAGGTCGTGT
GACCATGACAGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCTC
TCTGCGTTCTGAGGACACAGCCGTTTACTACTGCGCCAGAGGCAACGACTA
CGACGCTTGTTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTGTCTCTC
CGGATCCACATCCGGCAGCGGAAAGCCCCGGTAGCGGCGAGGGCAGCACCA
AAGGAGACATCGTCATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGTCTTTAGG
CGAAAGAGTGACCATGAACTGCAAGTCCAGCCAGTCTTTACTGAATTCCGGC
ACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTA
AGCTGCTGATCTACTGGGCTAGCATTGAGAATCCGGCGTGCCCGATCGCT
TTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGC
AAGCTGAGGACGTGGCTGTGTACTATTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACAC
CTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGAGATCAAGGGGTCCACCACGACGCCAG
CGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAACCCCTGTCC
CTGCGCCCCGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACGA
GGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGG
ACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTATTGCAAACGGG
GCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA
ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAA
GGAGGATGTGAATTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC
CTATCAGCAAGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATTTAGGGCGAAG
AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGGCGTGGCCGGGACCCCGAAATGG
GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCTTGTACAATGAATTGC
AGAAGGATAAGATGGCGGAGGCATACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCGACGATGGCCTTTATCAGGGTCTCAGTACAGC

CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAAGCCCTGCCCCCTCGCGG
 CTCTGGAGAGGGCAGAGGCTCTCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAAGAGA
 ACCCAGGCCCCATGGGAAGAGGTTTACTGAGAGGACTGTGGCCTTTACACA
 TCGTGCTGTGGACTCGTATCGCCAGCACCATCCCCCCCCATGTCCAAAAGA
 GCGTGAACAACGACATGATCGTGACCGACAACAATGGCGCCGTGAAGTTCC
 CCCAGCTGTGCAAGTTCTGCGACGTGAGGTTTACGCACTTGTGACAACCAGA
 AGAGCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAG
 AAGTGTGCGTGGCCGTGTGGAGGAAGAACGACGAGAACATCACTTTAGAGA
 CAGTGTGCCACGACCCCAAGCTGCCCTACCACGACTTCATTTTAGAAGATGC
 CGCCAGCCCCAAGTGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGCGAGACCT
 TCTTCATGTGTTCTTGTTCTGCTGATGAGTGCAACGATAACATCATCTTCAGC
 GAGGAGTACAACACCAGCAACCCCGATTTACTGCTGGTGATCTTCCAAGTTA
 CCGGCATTTCTTTACTGCCTCCGTTGGGCGTGGCTATCAGCGTGATCATCAT
 CTTCTACTGCTAT (sec. con núm. de ident.: 116).

En una modalidad, un CAR de unión al GPC3 enlazado a un receptor de DN TGF- β tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 116.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYP
 GSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWF
 VYWGQGTLVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMN
 CKSSQSLLNSGTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTD
 FTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGTKLEIKGSLDNEKSNGTIIHVKGKHLCL
 PSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPL
 RRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
 REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
 RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPM
 GRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCQDVR

FSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFIL
 EDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPDLLLVIQVTGI
 SLLPPLGVAISVIIIIFYCY (sec. con núm. de ident.: 116). En las modalidades, un CAR
 de unión al GPC3 es codificado por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de
 identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos
 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; p. ej., 85-90 %, 85-95 %, 85-100 %, 90-95 %, 90-100 %, o 95-100 %) con el ácido nucleico que tiene la secuencia de
 acuerdo con:

CAAGTCCAACTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCCGGAGCCAGC
 GTGAAAGTCTCATGTAAAACAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCCA
 CTGGGTCCGACAAGCCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCTAC
 CCCGGCTCCGGCAACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCAAGGTCGTGTGACCA
 TGACAGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCTCTGCG
 TTCTGAGGACACAGCCGTTTACTACTGCGCCAGAGGCAACGACTACGACGCT
 TGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTGTCTCTCCGGATCCA
 CATCCGGCAGCGGAAAGCCCGGTAGCGGCGAGGGCAGCACCAAAGGAGACA
 TCGTCATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGTCTTTAGGCGAAAGAGTG
 ACCATGAACTGCAAGTCCAGCCAGTCTTTACTGAATTCCGGCACTCGAAAAAA
 CTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCT
 ACTGGGCTAGCATTGAGAAATCCGGCGTGCCCGATCGCTTTAGCGGCAGCGG
 TAGCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGAGGACGTG
 GCTGTGTACTATTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAAC
 AAAGCTGGAGATCAAGGGGTCCCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCAT
 ATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTC
 TAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCT
 TGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTCCGATCAAAAAGGAGCAGG
 CTCCTGCACAGTGAATGACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCC
 GCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTC
 CCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAAGG

GCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT
 GTTTTGGACAAGAGGCGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGA
 AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGG
 CGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGG
 GGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGA
 CGCCCTTCACATGCAAGCTCTGCCCCCTCGCGGCTCTGGAGAGGGGCAGAGG
 CTCTCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAAGAGAACCCAGGCCCCATGGGAAG
 AGGTTTACTGAGAGGACTGTGGCCTTTACACATCGTGCTGTGGACTCGTATCG
 CCAGCACCATCCCCCCCCATGTCCAAAAGAGCGTGAACAACGACATGATCGT
 GACCGACAACAATGGCGCCGTGAAGTTCCCCCAGCTGTGCAAGTTCTGCGAC
 GTGAGGTTTCAGCACTTGTGACAACCAGAAGAGCTGCATGAGCAACTGCAGCA
 TCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGAGGAA
 GAACGACGAGAACATCACTTTAGAGACAGTGTGCCACGACCCCCAAGCTGCCC
 TACCACGACTTCATTTTAGAAGATGCCGCCAGCCCCAAGTGCATCATGAAGGA
 GAAGAAGAAGCCCGGCGAGACCTTCTTCATGTGTTCTTGTTCTGATGAGT
 GCAACGATAACATCATCTTCAGCGAGGAGTACAACACCAGCAACCCCGATTTA
 CTGCTGGTGATCTTCCAAGTTACCGGCATTTCTTTACTGCCTCCGTTGGGCGT
 GGCTATCAGCGTGATCATCATCTTCTACTGCTAT (sec. con núm. de ident.: 117).

“Polipéptido”, “fragmento de polipéptido”, “péptido” y “proteína” son, a menos que se especifique lo contrario, y de acuerdo con el significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica, p. ej., pueden comprender una secuencia de proteína de longitud completa o un fragmento de una proteína de longitud completa, y pueden incluir modificaciones postransferencia del polipéptido, p. ej., glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y lo similar, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural. En diversas modalidades, los polipéptidos contemplados en la presente descripción comprenden una secuencia señal (o líder) en el terminal N de la proteína, que dirige a la transferencia de la proteína cotransferencialmente o postransferencialmente.

Los polipéptidos incluyen “variantes de polipéptidos”. Las variantes de polipéptidos pueden diferir de un polipéptido de origen natural en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Tales variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, al modificar una o más de las secuencias de polipéptidos anteriores. Por ejemplo, en algunas modalidades, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de los receptores de DN TGF- β diseñados genéticamente y receptores CAR y TCR de unión al GPC3 diseñados genéticamente. al introducir una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Preferentemente, los polipéptidos de la descripción incluyen polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % de identidad de aminoácidos con estos. Los polipéptidos de la descripción incluyen variantes que tienen al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en la presente descripción (ver, p. ej., listado de secuencias), típicamente donde la variante mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia. Los polipéptidos incluyen “fragmentos de polipéptidos”. Los fragmentos de polipéptidos se refieren a un polipéptido, que puede ser monomérico o multimérico que tiene una deleción del terminal amino, una deleción del terminal carboxilo, y/o una deleción o sustitución interna de un polipéptido de origen natural o producido recombinantemente. En ciertas modalidades, un fragmento de polipéptido puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. Se apreciará que en ciertas modalidades, los fragmentos tienen una longitud de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, o 450 aminoácidos.

El polipéptido también puede ser fusionado en el cuadro o conjugado a un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (p.

ej., poli-His), o para potenciarla unión del polipéptido a un soporte sólido. Como se indicó anteriormente, los polipéptidos de la presente descripción pueden alterarse de varias maneras que incluyen sustituciones, deleciones, truncamientos, e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido de referencia pueden prepararse mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones de la secuencia de nucleótidos son muy conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 82: 488–492), Kunkel *et al.*, (1987, *Methods in Enzymol.* 154: 367–382), patente de los EE. UU. No. 4,873,192, Watson, J. D. *et al.*, (*Molecular Biology of the Gene*, cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias citadas en este. La guía con respecto a las sustituciones de aminoácidos adecuadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés se puede encontrar en el modelo de Dayhoff *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

En ciertas modalidades, una variante contendrá sustituciones conservadoras. Una “sustitución conservadora” es aquella en la que se sustituye un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades similares, de tal manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no cambie sustancialmente. Se puede hacer modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente descripción y aún obtener una molécula funcional que codifica un polipéptido variante o derivado con las características deseables.

Las variantes de polipéptidos incluyen además formas glicosiladas, conjugados agregantes con otras moléculas, y conjugados covalentes con restos químicos no relacionados (p. ej., moléculas pegiladas). Las variantes covalentes pueden prepararse al enlazar funcionalidades con grupos que se encuentran en la cadena de aminoácidos o en el residuo del terminal N o C, como se conoce en la técnica. Las variantes también incluyen variantes alélicas, variantes de especies, y muteínas. Los

truncamientos o deleciones de regiones que no afectan la actividad funcional de las proteínas también son variantes.

Cuando se desea la expresión de dos o más polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos que las codifican pueden separarse mediante una secuencia IRES. En otra modalidad, dos o más polipéptidos pueden expresarse como una proteína de fusión que comprende una o más secuencias de polipéptidos de autoescisión, tales como un polipéptido T2A. En una modalidad, una secuencia de polipéptidos de autoescisión tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) la sec. con núm. de ident.: 118. EGRGSLTCTGCDVEENPGP (sec. con núm. de ident.: 118). En las modalidades, un polipéptido de autoescisión es codificado por un ácido nucleico que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con (tal como, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 100 % de identidad; *p. ej.*, 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 %, o 95–100 %) con el ácido nucleico que tiene la secuencia de acuerdo con: GAGGGCAGAGGCTCTCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAAGAGAACCCAGG CCCC (sec. con núm. de ident.: 119). En otras modalidades, se expresan dos o más polipéptidos a partir de diferentes promotores y pueden estar en dos o más vectores. En algunas modalidades, un CAR o TCR de unión al GPC3 se codifica en el mismo vector que un receptor de DN TGF- β diseñado genéticamente y se enlaza operativamente al mismo promotor del receptor DN TGF- β diseñado genéticamente donde las secuencias se separan por una secuencia de IRES. En algunas modalidades, un CAR o TCR de unión al GPC3 se codifica en el mismo vector que un receptor de DN TGF- β diseñado genéticamente y se enlaza operativamente a un promotor diferente al promotor del receptor de DN TGF- β diseñado genéticamente. En ciertas modalidades, el CAR o TCR de unión al GPC3 se expresa en una célula que también ha sido diseñada genéticamente

para expresar un receptor quimérico de dominio sushi IL-15-IL-15R α unido a una membrana diseñada genéticamente, tal como se describe en la patente provisional de los EE. UU. núm. 63/159.610, presentada el 11 de marzo de 2021, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, un CAR o TCR de unión al GPC3 se codifica en el mismo vector que un receptor quimérico de dominio sushi IL-15-IL-15R α unido a una membrana diseñada genéticamente y se enlaza operativamente al mismo promotor que receptor quimérico de dominio sushi IL-15-IL-15R α unido a una membrana diseñado genéticamente donde las secuencias se separan por una secuencia IRES o un enlazador escindible. En algunas modalidades, un CAR o TCR de unión al GPC3 se codifica en el mismo vector que un receptor quimérico de dominio sushi IL-15-IL-15R α unido a una membrana diseñada genéticamente se enlaza operativamente a un promotor diferente al promotor del receptor quimérico de dominio sushi IL-15-IL-15R α unido a una membrana diseñada genéticamente. En algunas modalidades, un CAR de unión al GPC3 se codifica en un vector diferente al receptor quimérico de dominio sushi IL-15-IL-15R α unido a una membrana diseñada genéticamente.

Los polipéptidos de la presente descripción incluyen polipéptidos de fusión. En algunas modalidades, se proporcionan polipéptidos de fusión y polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión. Los polipéptidos de fusión y las proteínas de fusión se refieren a un polipéptido que tiene al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez o más segmentos de polipéptidos. Los polipéptidos de fusión se unen típicamente de extremo C a extremo N, aunque también pueden estar unidos de extremo C a extremo C, de extremo N a extremo N, o de extremo N a extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden o en un orden especificado. Los polipéptidos de fusión o las proteínas de fusión pueden incluir además variantes modificadas de manera conservadora, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias, y homólogos de interespecies, siempre que se mantenga la actividad transcripcional deseada del

polipéptido de fusión. Los polipéptidos de fusión pueden producirse mediante métodos de síntesis química o por enlace químico entre las dos entidades o pueden prepararse generalmente usando otras técnicas comunes. Las secuencias de ADN ligadas que comprenden el polipéptido de fusión se enlazan operativamente a elementos de control de transcripción o transferencia adecuados como se describe en otra parte de la presente descripción.

En una modalidad, una pareja de fusión comprende una secuencia que ayuda a expresar la proteína (un potenciador de la expresión) a rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Se pueden seleccionar otros componentes de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o permitir que la proteína se dirija a los compartimentos intracelulares deseados o para facilitar el transporte de la proteína de fusión a través de la membrana celular.

Los polipéptidos de fusión pueden comprender además una señal de escisión de polipéptidos entre cada uno de los dominios de polipéptidos descritos en la presente descripción. Además, el sitio de polipéptidos se puede colocar en cualquier secuencia de péptido enlazador. Las señales ilustrativas de escisión de polipéptidos incluyen sitios de reconocimiento de escisión de polipéptidos, tales como sitios de escisión de proteasa, sitios de escisión de nucleasas (p. ej., sitios de reconocimiento de enzimas de restricción raros, sitios de reconocimiento de ribozima de escisión de autorretención), y de oligopéptidos virales de autoescisión (ver deFelipe y Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

Los sitios de escisión de proteasa adecuados y los péptidos de autoescisión adecuados son conocidos por el experto en la técnica (ver, p. ej., en Ryan *et al.*, 1997. *J Gener. Viral.* 78, 699–722; Scymczak *et al.* (2004) *Nature Biotech.* 5, 589–594). Los sitios ilustrativos de escisión por proteasa incluyen, pero no se limitan a, los sitios de escisión de proteasas de potyvirus Nia (p. ej., proteasa del virus de grabado del tabaco), proteasas de potyvirus HC, proteasas de potyvirus PI (P35), proteasas de byovirus Nia, proteasas de byovirus codificados por ARN–2, proteasas de aftovirus L, proteasas de enterovirus 2A, proteasas de rinovirus 2A, proteasas de picoma 3C,

proteasas de comovirus 24K, proteasas de nepovirus 24K, proteasa similar al RTSV (virus esférico del tungro del arroz) 3C, proteasa similar al pYVF (virus de la mancha amarilla de la chirivía) 3C, heparina, trombina, factor Xa y enteroquinasa. Debido a su alta restricción de escisión, se pueden usar sitios de escisión de proteasa del TEV (virus de grabado del tabaco). En otras modalidades, los péptidos de autoescisión pueden incluir aquellas secuencias de polipéptidos obtenidas de los péptidos de potyvirus y cardiovirus 2A, FMDV (virus de la enfermedad del pie y la boca), virus de la rinitis equina A, virus Thosa asigna y teschovirus porcino. En otras modalidades, el sitio del polipéptido de autoescisión comprende un sitio, secuencia o dominio 2A o similar a 2A– (Donnelly *et al.*, 2001. *J Gen. Viral.* 82:1027–1041).

Generalmente, se entiende que puede usarse cualquier vector o vector viral adecuado para la transducción de constructos diseñados genéticamente descritos en la presente descripción. En una modalidad descrita en la presente descripción, una célula (p. ej., célula T o célula NK) se transduce con un vector retroviral, p. ej., un vector lentiviral. Como se usa en la presente descripción, el término “retrovirus” se refiere a un virus ARN que transcribe a la inversa su ARN genómico en una copia del ADN bicatenario lineal y posteriormente integra covalentemente su ADN genómico en un genoma huésped. Los retrovirus ilustrativos adecuados para usar en algunas modalidades incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (M–MuLV), virus de sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus de sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV), virus de leucemia de monos gibones (GaLV), virus de leucemia felina (FLV), espumavirus, virus de leucemia murina de Friend, virus de células madre murinas (MSCV) y virus de sarcoma de Rous (RSV) y lentivirus.

Como se usa en la presente descripción, el término “lentivirus” se refiere a un grupo (o género) de retrovirus complejos. Los lentivirus ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: VIH (virus de la inmunodeficiencia humana; que incluye el VIH tipo 1, y el VIH tipo 2); virus visna–maedi (VVM); virus de la artritis-encefalitis caprina (VAEC); virus de la anemia infecciosa equina (VAIE); virus de la inmunodeficiencia felina

(VIF); virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB); y virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS).

El término “vector” se usa en la presente descripción para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido generalmente se enlaza a, p. ej., se inserta en la molécula de ácido nucleico vector. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma en una célula, o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula huésped. Los vectores útiles incluyen, p. ej., plásmidos (p. ej., plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos, y vectores virales. Los vectores virales útiles incluyen, p. ej., retrovirus y lentivirus de replicación defectuosa.

Como será evidente para un experto en la técnica, el término “vector viral” se usa ampliamente para referirse a una molécula de ácido nucleico (p. ej., un plásmido de transferencia) que incluye elementos de ácido nucleico derivados de virus que típicamente facilitan la transferencia de la molécula de ácido nucleico o la integración en el genoma de una célula o a una partícula viral que media la transferencia de ácido nucleico. Las partículas virales incluirán típicamente varios componentes virales y a veces también componentes de la célula huésped además de ácido(s) nucleico(s).

El término vector viral puede referirse a un virus o partícula viral capaz de transferir un ácido nucleico a una célula o al mismo ácido nucleico transferido. Los vectores virales y plásmidos de transferencia contienen elementos genéticos estructurales y/o funcionales que se derivan principalmente de un virus. El término “vector retroviral” se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de estos, que se derivan principalmente de un retrovirus. El término “vector lentiviral” se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de estos, incluidas las RTL que se derivan principalmente de un lentivirus. El término “vector híbrido” se

refiere a un vector, RTL u otro ácido nucleico que contiene tanto secuencias virales retrovirales, p. ej., lentivirales, como secuencias no retrovirales. En una modalidad, un vector híbrido se refiere a un vector o plásmido de transferencia que comprende secuencias retrovirales, p. ej., lentivirales, secuencias para transcripción inversa, replicación, integración y/o empaquetamiento.

En algunas modalidades, los términos “vector lentiviral”, “vector de expresión lentiviral” pueden usarse para referirse a plásmidos de transferencia lentiviral y/o partículas lentivirales infecciosas. Cuando se hace referencia en la presente descripción a elementos tales como sitios de clonación, promotores, elementos reguladores, ácidos nucleicos heterólogos, etc., debe entenderse que las secuencias de estos elementos están presentes en forma de ARN en las partículas lentivirales de la descripción y están presentes en forma de ADN en los plásmidos del ADN de la descripción. En una modalidad descrita en la presente descripción, el vector de expresión es un vector de expresión de lentivirus.

En cada extremo del provirus hay estructuras llamadas “repeticiones terminales largas” o “RTL”. El término “repetición terminal larga (RTL)” se refiere a dominios de pares de base ubicados en los extremos de los ADN retrovirales que, en su contexto de secuencia natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5. Las RTL generalmente proporcionan funciones fundamentales para la expresión de genes retrovirales (p. ej., promoción, iniciación y poliadenilación de transcritos de genes) y para la replicación viral. La RTL contiene numerosas señales reguladoras que incluyen elementos de control transcripcional, señales de poliadenilación y secuencias necesarias para la replicación e integración del genoma viral. La RTL viral se divide en tres regiones llamadas U3, R, y U5. La región U3 contiene los elementos potenciadores y promotores. La región U5 es la secuencia entre el sitio de unión del cebador y la región R y contiene la secuencia de poliadenilación. La región R (repetición) está flanqueada por las regiones U3 y U5. La RTL se compone de las regiones U3, R y U5 y aparece en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Adyacente a la RTL 5' hay secuencias necesarias para la transcripción inversa del

genoma (el sitio de unión del cebador de ARNt) y para el empaquetamiento eficiente del ARN viral en partículas (el sitio Psi).

Como se usa en la presente descripción, la expresión “señal de empaquetamiento” o “secuencia de empaquetamiento” se refiere a secuencias ubicadas dentro del genoma retroviral que se requieren para la inserción del ARN viral en la cápside o partícula viral, ver, p. ej., Clever et al., 1995. J of Virology, vol. 69, núm. 4; págs. 2101–2109. Varios vectores retrovirales usan la señal de empaquetamiento mínima (también denominada secuencia psi [‘P’]) necesaria para la encapsidación del genoma viral. Por lo tanto, como se usa en la presente descripción, los términos “secuencia de empaquetamiento”, “señal de empaquetamiento”, “psi” y el símbolo “P” se usan en referencia a la secuencia no codificante requerida para la encapsidación de cadenas de ARN retroviral durante la formación de partículas virales.

En diversas modalidades, los vectores comprenden RTL 5' modificada y/o RTL 3'. Cualquiera o ambos de los RTL pueden comprender una o más modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, una o más deleciones, inserciones o sustituciones. Las modificaciones de la RTL 3' frecuentemente se hacen para mejorar la seguridad de los sistemas lentivirales o retrovirales al hacer que la replicación del virus sea defectuosa. Como se usa en la presente descripción, el término “de replicación defectuosa” se refiere al virus que no es capaz de replicarse de manera completa y efectiva, de tal manera que no se producen viriones infecciosos (p. ej., progenie lentiviral defectuosa de replicación defectuosa). El término “de replicación competente” se refiere al virus silvestre o virus mutante que es capaz de replicarse, de tal manera que la replicación viral del virus es capaz de producir viriones infecciosos (p. ej., progenie lentiviral de replicación competente).

Los vectores “autoinactivadores” (SIN, por sus siglas en inglés) se refieren a vectores defectuosos, p. ej., los vectores retrovirales o lentivirales, en los que la región potenciadora-promotora de RTL (3') derecha, conocida como la región U3, se ha modificado (p. ej., por delección o sustitución) para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Esto se debe a que la región U3 derecha de

la RTL (3') se usa como una plantilla para la región U3 izquierda de la RTL (5') durante la replicación viral y, por lo tanto, el transcrito viral no puede realizarse sin el potenciador-promotor de U3. En una modalidad adicional de la descripción, la RTL 3' se modifica de tal manera que la región U5 se reemplaza, por ejemplo, con una secuencia poli(A) ideal. Cabe señalar que las modificaciones a las RTL, tal como las modificaciones a RTL 3', RTL 5', o tanto RTL 3' como 5', también se contemplan en la presente descripción.

Se proporciona una mejora de la seguridad adicional reemplazando la región U3 de la RTL 5' con un promotor heterólogo para impulsar la transcripción del genoma viral durante la producción de partículas virales. Los ejemplos de promotores heterólogos que pueden usarse incluyen, p. ej., virus 40 de los simios (SV40) (p. ej., temprano o tardío), citomegalovirus (CMV) (p. ej., inmediato temprano), virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus del sarcoma de Rous (RSV), y promotores del virus del herpes simple (HSV) (timidina quinasa). Los promotores típicos son capaces de impulsar altos niveles de transcripción de una manera independiente de Tat. Este reemplazo reduce la posibilidad de recombinación para generar virus de replicación competente porque no hay secuencia U3 completa en el sistema de producción del virus. En ciertas modalidades, el promotor heterólogo tiene ventajas adicionales en el control de la manera en que se transcribe el genoma viral. Por ejemplo, el promotor heterólogo puede ser inducible, de tal manera que la transcripción de todo o parte del genoma viral ocurre solo cuando están presentes los factores de inducción. Los factores de inducción incluyen, pero no se limitan a, uno o más compuestos químicos o las condiciones fisiológicas tales como temperatura o pH, en los que se cultivan las células huésped.

En algunas modalidades, los vectores virales comprenden un elemento TAR. El término "TAR" se refiere al elemento genético "de respuesta de trans-activación" ubicado en la región R de las RTL lentivirales (p. ej., VIH). Este elemento interactúa con el elemento genético del trans-activador (tat) lentiviral para potenciar la replicación viral.

La “región R” se refiere a la región dentro de las RTL retrovirales que comienza al inicio del grupo de encapsulación (es decir, el inicio de la transcripción) y termina inmediatamente antes del inicio del tracto poli A. La región R también está definida como flanqueada por las regiones U3 y U5. La región R desempeña una función durante la transcripción inversa al permitir la transferencia de ADN naciente desde un extremo del genoma al otro.

Como se usa en la presente descripción, el término “elemento FLAP” se refiere a un ácido nucleico cuya secuencia incluye el tracto de polipurina central y las secuencias de terminación centrales (cPPT y CTS, por sus siglas en inglés) de un incluye el tracto central de polipurina y las secuencias de terminación centrales (cPPT y CTS) de un retrovirus, p. ej., VIH-I o VIH-2. Los elementos FLAP adecuados se describen en la patente de los EE. UU. núm. 6,682,907 y en Zennou, et al., 2000, *Cell*, 101: 173. Durante la transcripción inversa del VIH-I, el inicio central del ADN de la cadena adicional en el tracto de polipurina central (cPPT) y la terminación central en la secuencia de terminación central (CTS) conducen a la formación de una estructura de ADN de tres cadenas: el Flap de ADN central del VIH-I. Sin desear limitarse a ninguna teoría, el Flap de ADN puede actuar como un determinante de cis-activo de la importación nuclear del genoma lentiviral y/o puede aumentar el título del virus.

En una modalidad, los vectores de transferencia retrovirales o lentivirales comprenden uno o más elementos de exportación. El término “elemento de exportación” se refiere a un elemento en cis regulador postranscripcional que regula el transporte de un transcrito de ARN desde el núcleo al citoplasma de una célula. Los ejemplos de elementos de exportación de ARN incluyen, pero no se limitan a, el elemento de respuesta rev (RRE) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (ver, p. ej., Cullen et al., 1991. *J Virol.* 65: 1053; y Cullen et al., 1991. *Cell* 58: 423), y el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis B (HPRE). Generalmente, el elemento de exportación de ARN se coloca dentro de la UTR 3' de un gen, y puede insertarse como una o múltiples copias.

En otras modalidades, la expresión de secuencias heterólogas en vectores virales aumenta al incorporar elementos reguladores postranscripcionales, sitios de poliadenilación eficaces y, opcionalmente, señales de terminación de transcripción en los vectores. Una variedad de elementos reguladores postranscripcionales puede aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo en la proteína, p. ej., elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE; Zufferey et al., 1999, *J Virol.*, 73:2886); el elemento regulador postranscripcional presente en el virus de la hepatitis B (HPRE) (Huang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864); y lo similar (Liu et al., 1995, *Genes Dev.*, 9:1766).

En algunas modalidades, los vectores pueden incluir oligonucleótidos reguladores que tienen actividad reguladora de transcripción o transferencia. Tal oligonucleótido puede usarse en una variedad de configuraciones de expresión génica para regular el control de la expresión. Un oligonucleótido regulador transcripcional puede aumentar (potenciar) o disminuir (silenciar) el nivel de expresión de un constructo de expresión recombinante. Los oligonucleótidos reguladores pueden regular selectivamente la expresión de una manera específica al contexto, que incluye, por ejemplo, para conferir la expresión del polinucleótido específica del tejido, específica del desarrollo, o lo similar, que incluye expresión constitutiva o inducible. Un oligonucleótido regulador de la descripción también puede ser un componente de un vector de expresión o de una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende el oligonucleótido regulador enlazado operativamente a un polinucleótido expresable. Un elemento regulador puede tener varias longitudes desde unos pocos nucleótidos hasta varios cientos de nucleótidos.

Los elementos que dirigen la eficiente terminación y poliadenilación de las transcripciones de ácido nucleico heterólogo aumentan la expresión génica heteróloga. Las señales de terminación de la transcripción se encuentran generalmente corriente abajo de la señal de poliadenilación. En algunas modalidades, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que

codifica un polipéptido que va a expresarse. El término “sitio poli A” o “secuencia poli A”, como se usa en la presente descripción, denota una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación del transcrito de ARN naciente por la ARN polimerasa II. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm al añadir una cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante y, por lo tanto, contribuir a un aumento de la eficiencia de transferencia. La poliadenilación eficiente del transcrito recombinante es deseable ya que los transcritos que carecen de una cola poli A son inestables y se degradan rápidamente. Los ejemplos ilustrativos de señales de poli A que pueden usarse en un vector de la descripción incluyen una secuencia de poli A ideal (p. ej., AATAAA, ATATAA, AGTAAA), una secuencia de poli A de hormona de crecimiento bovina (BGHPA), una secuencia de β -globina poli A de conejo (r β gpA) u otra secuencia de poli A heteróloga o endógena adecuada conocida en la técnica.

En la presente descripción también se describen ácidos nucleicos “optimizados por codones”. Un ácido nucleico “optimizado por codones” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se ha alterado de tal manera que los codones son óptimos para la expresión en un sistema particular (tal como una especie o grupo particular de especies). Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico puede optimizarse para la expresión en células de mamíferos o en una especie particular de mamífero (tales como células humanas) al reemplazar al menos uno, más de uno, o un número significativo de codones de la secuencia nativa con codones que se usan más frecuentemente o con mayor frecuencia en los genes de esa especie. La optimización de codones no altera la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

Las secuencias de nucleótidos optimizadas por codones pueden presentar propiedades mejoradas relacionadas con la eficacia de expresión. En algunas modalidades, la secuencia de ADN que va a transcribirse puede optimizarse para facilitar una transcripción y/o transferencia más eficiente. En algunas modalidades, la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto a los elementos reguladores cis (p. ej., caja TATA, señales de terminación, y sitios de unión a proteínas), sitios

de recombinación artificial, sitios chi, contenido de dinucleótidos CpG, islas CpG negativas, contenido de GC, sitios de deslizamiento de polimerasa, y/u otros elementos relevantes para la transcripción; la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto a sitios de empalme críptico, estructura secundaria de ARNm, energía libre estable de ARNm, secuencias repetitivas, dominio de inestabilidad de ARN, y/u otros elementos relevantes para el procesamiento y estabilidad del ARNm; la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto a la tendencia de uso de codones, adaptabilidad de codones, sitios chi internos, sitios de unión ribosomal (p. ej., IRES), sitios polyA prematura, secuencias de Shine-Dalgarno (SD), y/u otros elementos relevantes para la transferencia; y/o la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto al contexto de codones, interacción de codón-anticodón, sitios de pausa de transferencia y/u otros elementos relevantes para el plegamiento de proteínas. -----

Los vectores pueden tener uno o más RTL, en donde cualquier RTL comprende una o más modificaciones, tales como una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos. Los vectores pueden comprender además uno o más elementos accesorios para aumentar la eficiencia de transducción (p. ej., un cPPT/FLAP), un empaquetamiento viral (p. ej., una señal de empaquetamiento de Psi (Ψ), RRE), y/u otros elementos que aumentan la expresión génica terapéutica (p. ej., secuencias de poli(A)), y pueden comprender opcionalmente un WPRE o HPRE. El experto en la técnica apreciaría que muchas otras modalidades diferentes pueden diseñarse en base a las modalidades existentes de la descripción. --

Una “célula huésped” incluye células transfectadas, infectadas, o transducidas in vivo, ex vivo o in vitro con un vector recombinante o un polinucleótido de la descripción. Las células huésped pueden incluir células empaquetadoras, células productoras, y células infectadas con vectores virales. En algunas modalidades, las células huésped infectadas con el vector viral de la descripción se administran a un sujeto que necesita tratamiento. En ciertas modalidades, el término “célula diana” se usa indistintamente con una célula huésped y se refiere a células transfectadas, infectadas o transducidas

de un tipo de célula deseado. En algunas modalidades, la célula diana es una célula T.

La producción de partículas virales a gran escala es frecuentemente necesaria para lograr un título viral razonable. Las partículas virales se producen al transfectar de un vector de transferencia en una línea celular de empaquetamiento que comprende genes virales estructurales y/o accesorios, p. ej., genes gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx, o nef u otros genes retrovirales.

Como se usa en la presente descripción, el término “vector de empaquetamiento” se refiere a un vector de expresión o vector viral que carece de una señal de empaquetamiento y comprende un polinucleótido que codifica uno, dos, tres, cuatro o más genes virales estructurales y/o accesorios. Típicamente, los vectores de empaquetamiento se incluyen en una célula empaquetadora y se introducen en la célula a través de transfección, transducción o infección. Los expertos en la técnica conocen los métodos para la transfección, transducción o infección. Un vector de transferencia retroviral/lentiviral de la presente descripción puede introducirse en una línea celular de empaquetamiento, a través de transfección, transducción o infección, para generar una célula productora o línea celular. Los vectores de empaquetamiento de la presente descripción se pueden introducir en células o líneas celulares humanas mediante métodos comunes que incluyen, p. ej., transfección con fosfato de calcio, lipofección o electroporación. En algunas modalidades, los vectores de empaquetamiento se introducen en las células junto con un marcador seleccionable dominante, tal como neomicina, higromicina, puromicina, blastocidina, zeocina, timidina quinasa, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido de la selección en presencia del fármaco adecuado y el aislamiento de clones. Un gen marcador seleccionable puede unirse físicamente a genes que codifican el vector de empaquetamiento, p. ej., mediante IRES o péptidos virales de autoescisión.

Las proteínas de la envoltura viral (env) determinan el rango de células huésped que finalmente pueden infectarse y transformarse mediante retrovirus

recombinantes generados a partir de las líneas celulares. En el caso de los lentivirus, tales como VIH-1, VIH-2, VIS, VIF y VIE, las proteínas env incluyen gp41 y gp120. En algunas modalidades, las proteínas de envoltura viral expresadas por las células empaquetadoras de la descripción están codificadas en un vector separado de los genes virales gag y pol, como se ha descrito previamente.

Los ejemplos ilustrativos de genes env derivados de retrovirales que pueden usarse en las modalidades descritas en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a: Las envolturas VLM, la envoltura IOAI, el BAEV, FeLV-B, RDI 14, SSAV, ébola, Sendai, FPV (virus de la plaga de Fowl), y las envolturas de virus de la influenza. De manera similar, se pueden usar genes que codifican envolturas de virus de ARN (p. ej., familias de virus de ARN de Picomaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Bimaviridae, Retroviridae), así como de los virus de ADN (familias de Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae, y Iridoviridae). Los ejemplos representativos incluyen FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, Rabia, ALV, VIB, BL V, VEB, VAEC, SNV, ChTL V, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CTIO, y VAIE.

En otras modalidades, las proteínas de envoltura para pseudotipado de un virus de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguiente virus: Influenza A tal como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (gripe aviar), Influenza B, virus de la Influenza C, virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C, virus de la Hepatitis D, virus de la Hepatitis E, Rotavirus, cualquier virus del grupo de virus Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, virus de la fiebre del dengue, viruela de los simios, mononegavirales, lisavirus tales como el virus de la rabia, virus del murciélago de Lagos, virus Mokola, virus Duvenhage, virus del murciélago europeo 1 y 2, y virus del murciélago australiano, virus de la fiebre efímera, virus de la vesícula, virus de la estomatitis vesicular (VEV), virus del herpes

tales como el virus del herpes simple de tipo 1 y 2, varicela zóster, citomegalovirus, virus de Epstein–Barr (VEB), virus del herpes humano (VHH), virus del herpes humano de tipo 6 y 8, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma, virus del herpes murino gamma, arenavirus tales como virus de la fiebre hemorrágica argentina, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, virus de la fiebre hemorrágica asociada a Sabia, virus de la fiebre hemorrágica venezolana, virus de la fiebre de Lassa, virus de Machupo, virus de la coriomeningitis linfocitaria (VCL), Bunyaviridae tales como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea y el Congo, hantavirus, fiebre hemorrágica con virus que causa síndrome renal, virus de la fiebre de Rift Valley, Filoviridae (filovirus) que incluyen fiebre hemorrágica del ébola y fiebre hemorrágica de Marburgo, Flaviviridae que incluyen virus de la enfermedad del bosque de Kaysanur, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, virus que causa encefalitis transmitido por garrapatas y Paramyxoviridae tales como virus Hendra y virus Nipah, viruela mayor y viruela menor (viruela), alfavirus tales como el virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis equina occidental, coronavirus asociado al SARS (SARS–Co V), virus del Nilo occidental, o cualquier otro virus que causa encefalitis.

Los términos “pseudotipo” o “pseudotipado”, como se usan en la presente descripción, se refieren a un virus cuyas proteínas de envoltura viral han sido sustituidas con aquellas de otro virus que posee otras características. Por ejemplo, el VIH puede pseudotiparse con la proteína de envoltura del virus de la estomatitis vesicular G (VSV–G), que permite al VIH infectar un rango más amplio de células porque las proteínas de la envoltura del VIH (codificadas por el gen *env*) normalmente dirigen el virus a las células que presentan CD4+.

Como se usa en la presente descripción, el término “líneas celulares de empaquetamiento” se usa en referencia a líneas celulares que no contienen una señal de empaquetamiento, pero que expresan de manera estable o transitoria proteínas estructurales virales y enzimas de replicación (p. ej., gag, pol y env) que son necesarias para el embalaje correcto de partículas virales. Se puede emplear cualquier línea

celular adecuada para preparar las células de empaquetamiento de la descripción. Generalmente, las células son células de mamífero. En otra modalidad, las células usadas para producir la línea celular de empaquetamiento son células humanas. Las líneas celulares adecuadas que se pueden usar para producir la línea celular de empaquetamiento incluyen, p. ej., células CHO, células BHK, células MDCK, células C3H 10T1/2, células FLY, células Psi-2, células BOSC 23, células P A317, células WEHI, células COS, células BSC 1, células BSC 40, células BMT 10, células VERO, células W138, células MRC5, células A549, células HTI080, células 293, células 293T, células B-50, células 3T3, células NIH3T3, células HepG2, células Saos-2, células Huh7, células HeLa, células W163, células 211, y células 211A.

Como se usa en la presente descripción, el término “línea celular productora” se refiere a una línea celular que es capaz de producir partículas retrovirales recombinantes, que comprende una línea celular de empaquetamiento y un constructo de vector de transferencia que comprende una señal de empaquetamiento. La producción de partículas virales infecciosas y soluciones madre virales puede realizarse usando técnicas convencionales. Los métodos para preparar soluciones madre virales son conocidos en la técnica y se ilustran, p. ej., en Y. Soneoka et al. (1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628–633, y N. R. Landau et al. (1992) *J Virol.* 66:5110–5113. Las partículas de virus infecciosos pueden recolectarse de las células de empaquetamiento usando técnicas convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas pueden recolectarse mediante lisis celular o recolección del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, si se desea, las partículas de virus recolectadas pueden purificarse. Las técnicas de purificación adecuadas son muy conocidas los expertos en la técnica.

La administración de un gen(es) u otra secuencia de polinucleótidos usando un vector retroviral o lentiviral por medio de la infección viral en lugar de la transfección se denomina “transducción” En una modalidad, los vectores retrovirales se transducen en una célula a través de infección e integración de provirus. En ciertas modalidades, una célula diana, p. ej., una célula T o célula NK, se “transduce” si

comprende un gen u otra secuencia de polinucleótidos suministrada a la célula mediante la infección usando un vector viral o retroviral. En algunas modalidades, una célula transducida comprende uno o más genes u otras secuencias de polinucleótidos administradas por un vector retroviral o lentiviral en su genoma celular.

Se describen células huésped que expresan uno o más de los constructos de la descripción. Las células huésped pueden transducirse con uno o más vectores virales que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más polipéptidos que expresan un TCR y/o un CAR diseñados genéticamente. Otros métodos relacionados con el uso de vectores virales en la genoterapia, que pueden usarse según ciertas modalidades de la presente descripción, pueden encontrarse, p. ej., en Kay, M.A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.): 138S–142S; Ferry, N. y Heard, J.M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975–81; Shiratory, Y. et al., (1999) *Liver* 19:265–74; Oka, K. et al., (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179–86; Thule, P. M. y Liu, J.M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744–52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335–56; Alt, M. (1995) *J Hepatol.* 23:746–58; Brody, S. L. y Crystal, R.G. (1994) *Ann. NY Acad. Sci.* 716:90–101; Strayer, D.S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159–2172; Smith–Arica, J. R. y Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43–49; y Lee, H. C. et al., (2000) *Nature* 408:483–8.

Las composiciones descritas en la presente descripción pueden comprender uno o más polinucleótidos, polipéptidos, vectores que comprenden estos, y composiciones de células T y composiciones NK, como se contempla en la presente descripción. Una modalidad descrita en la presente descripción es una composición que comprende una célula T modificada que expresa un TCR y/o CAR de unión al GPC3. Otra modalidad descrita en la presente descripción es una composición que comprende un linfocito NK modificado que expresa un TCR y/o CAR de unión al GPC3. Las composiciones incluyen, pero no se limitan a, composiciones farmacéuticas. Una “composición farmacéutica” se refiere a una composición formulada en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente

aceptables para la administración a una célula o un animal, ya sea sola, o en combinación con una o más de otras modalidades de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones de la presente descripción pueden administrarse en combinación con otros agentes, tales como, p. ej., citocinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas, quimioterapéuticos, profármacos, fármacos, anticuerpos, u otros agentes farmacéuticamente activos diversos. No existe virtualmente ningún límite a otros componentes que también puedan incluirse en las composiciones, siempre que los agentes adicionales no afecten negativamente la capacidad de la composición para suministrar la terapia prevista.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se emplea en la presente descripción para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosis que, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para usar en contacto con los tejidos humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación riesgo/beneficio razonable.

Como se usa en la presente descripción “portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye sin limitación a cualquier adyuvante, portador, excipiente, agente deslizante, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador de sabor, surfactante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizador, agente isotónico, solvente, surfactante, o emulsionante que ha sido aprobado por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos como aceptables para usar en humanos o animales domésticos. Los portadores farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; goma tragacanto; malta; gelatina; talco; mantequilla de cacao, ceras, grasas animales y vegetales, parafinas, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de zinc; aceites, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de

sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de frijol de soya; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes reguladores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones reguladoras de fosfato; y cualquier otra sustancia compatible usada en formulaciones farmacéuticas.

En una modalidad descrita en la presente descripción, las composiciones de la presente descripción comprenden una cantidad de células T o células NK modificadas contempladas en la presente descripción. Generalmente, se puede decir que una composición farmacéutica que comprende las células T o células NK contempladas en la presente descripción se puede administrar en una dosis de 10^2 a 10^{10} células/kg de peso corporal, 10^5 a 10^9 células/kg de peso corporal, 10^5 a 10^8 células/kg de peso corporal, 10^5 a 10^7 células/kg de peso corporal, 10^7 a 10^9 células/kg de peso corporal, o 10^7 a 10^8 /kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de esos rangos. La cantidad de células dependerá del uso final para el cual se destina la composición, así como el tipo de células incluidas en esta. Las células T o células NK modificadas para expresar un TCR o CAR diseñados genéticamente a pueden administrarse varias veces en dosis dentro de estos rangos. Las células pueden ser alogénicas, singénicas, xenogénicas, o autólogas para el paciente sometido a terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (p. ej., PHA) o linfocinas, citocinas, y/o quimiocinas (p. ej., IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-15, IL-12, TNF-alfa, IL-18, y TNF-beta, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , etc.) como se describe en la presente descripción para potenciar el injerto y la función de las células T infundidas.

Generalmente, las composiciones que comprenden las células activadas y expandidas como se describen en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento y prevención de enfermedades que surgen en individuos que están inmunocomprometidos o inmunosuprimidos. En algunas, se usan composiciones

que comprenden las células T o células NK modificadas contempladas en la presente descripción en el tratamiento de variedades de cáncer. Las células T o células NK modificadas descritas en la presente descripción pueden administrarse solos o como una composición farmacéutica en combinación con portadores, diluyentes, excipientes, y/o con otros componentes tales como IL-2, IL-7, y/o IL-15 u otras citocinas o poblaciones celulares. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente descripción comprenden una cantidad de células T o células NK modificadas genéticamente, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden células T o células NK modificadas contempladas en la presente descripción pueden comprender además amortiguadores tales como solución salina amortiguada neutra, solución salina amortiguada con fosfato y lo similar; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente descripción se pueden formular para la administración parenteral, p. ej., administración intravascular (intravenosa o intraarterial), intraperitoneal o intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, tal como solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como solvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; amortiguadores tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la

tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas desechables o frascos de dosis múltiples de vidrio o plástico. También se incluye una composición farmacéutica inyectable estéril.

En algunas modalidades, las composiciones contempladas en la presente descripción comprenden una cantidad efectiva de una composición expandida de linfocitos NK o linfocitos NK modificados, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Por lo tanto, las composiciones de células T o células NK pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos de cáncer conocidos, tales como radioterapia, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con antibióticos y agentes antivirales. Tales agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento para un estado patológico como se describe en la presente descripción, tal como un cáncer. En una modalidad, las composiciones contempladas en la presente descripción también pueden administrarse con inhibidores de TGF- β , por ejemplo, el inhibidor de molécula pequeña LY55299. Los agentes terapéuticos ilustrativos contemplados incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, FAME, antiinflamatorios, quimioterapéuticos, radioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos, u otros agentes activos y auxiliares.

En ciertas modalidades, las composiciones que comprenden células T o células NK contempladas en la presente descripción pueden administrarse en conjunto con cualquier número de agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen continuar altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosfaoramida y trimemilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de

mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, y mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramamicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-díazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como demopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina;

platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RPS 2000; difluorometilomitina (DMFO); derivados del ácido retinoico tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileucin diftitox); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Una variedad de otros agentes terapéuticos pueden usarse junto con las composiciones descritas en la presente descripción. En una modalidad, la composición que comprende células T se administra con un agente antiinflamatorio. Los agentes o fármacos antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, esteroides y glucocorticoides (que incluyen betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que incluyen aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato. En algunas modalidades, los AINE se seleccionan del grupo que consiste en ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de Cox-2 tales como VIOXX® (rofecoxib) y CELEBREX® (celecoxib), y sialilatos. Los analgésicos ilustrativos se seleccionan del grupo que consiste en acetaminofén, oxicodona, tramadol o clorhidrato de proporxifeno. Los glucocorticoides ilustrativos se seleccionan del grupo que consiste en cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, o prednisona. Los modificadores de respuesta biológica ilustrativos

incluyen moléculas dirigidas contra marcadores de superficie celular (p. ej., CD4, CD5, etc.), inhibidores de citocinas, tales como los antagonistas de TNF (p. ej., etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) e infliximab (REMICADE®), inhibidores de quimiocinas e inhibidores de moléculas de adhesión. Los modificadores de respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales así como formas recombinantes de moléculas. Los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad ilustrativos (FAME) incluyen azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, oro (oral (auranofina) e intramuscular) y minociclina.

En otras modalidades, los anticuerpos terapéuticos adecuados para la combinación con las células T o células NK modificadas con CAR o TCR contemplados en la presente descripción, incluyen, pero no se limitan a, abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, altumomab, amatuximab, anatumomab, arcitumomab, bavituximab, bectumomab, bevacizumab, bivatumumab, blinatumomab, brentuximab, cantuzumab, catumaxomab, cetuximab, citatuzumab, cixutumumab, clivatuzumab, conatumumab, daratumumab, drozitumab, duligotumab, dusigitumab, detumomab, dacetuzumab, dalotuzumab, ecromeximab, elotuzumab, ensituximab, ertumaxomab, etaracizumab, farietuzumab, ficlatuzumab, figitumumab, flantovotumab, futuximab, ganitumab, gemtuzumab, girentuximab, glembatumumab, ibritumomab, igovomab, imgatuzumab, indatuximab, inotuzumab, intetumumab, ipilimumab, iratumumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, mapatumumab, matuzumab, milatumumab, minretumomab, mitumomab, moxetumomab, namatumab, naptumomab, necitumumab, nimotuzumab, nofetumomab, ocaratuzumab, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab, oregovomab, panitumumab, parsatuzumab, patritumab, pemtumomab, pertuzumab, pintumomab, pritumumab, racotumomab, radretumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, satumomab, sibrotuzumab, siltuximab, simtuzumab, solitomab, tacatuzumab, taplitumomab, tenatumomab, teprotumumab, tigatuzumab, tositumomab, trastuzumab,

tucotuzumab, ublituximab, veltuzumab, vorsetuzumab, votumumab, zalutumumab, CC49 y 3F8.

En algunas modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción se administran junto con una citocina. Como se usa en la presente descripción, “citocina” significa un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas, quimiocinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen las hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana N-metionil, y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteínicas tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora de Müller; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF), tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores de osteoinducción; interferones tales como interferón alfa, beta, y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF); y granulocitos-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando del kit (KL). Como se usa en la presente descripción, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Cualquier célula puede usarse como una célula huésped para los polinucleótidos, los vectores o los polipéptidos de la presente descripción. En algunas modalidades, la célula puede ser una célula procariota, una célula fúngica, una célula de levadura, o células eucariotas superiores tales como una célula de mamífero. Las células procariotas adecuadas incluyen, sin limitarse a, eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, p. ej., enterobethaceae tal como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*; *Enterobacter*; *Erwinia*; *Klebsiella*; *Proteus*; *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*; *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescans*, y *Shigella*; Bacilos, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*; *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*; y estreptomicetos. En algunas modalidades, la célula es una célula humana. En algunas modalidades, la célula es una célula inmunitaria. En algunas modalidades, la célula inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en una célula T, una célula B, un linfocito infiltrante de tumor (TIL), una célula que expresa TCR, una célula citolítica natural (NK), una célula dendrítica, un granulocito, una célula linfoide innata, un megacariocito, un monocito, un macrófago, una plaqueta, un timocito, y una célula mieloide. En una modalidad, la célula inmunitaria es una célula T. En otra modalidad, la célula inmunitaria es un linfocito NK. En ciertas modalidades, la célula T es una célula que se infiltra en el tumor (TIL), célula T autóloga, célula T autóloga diseñada genéticamente(eACT™), una célula T alogénica, una célula T heteróloga, o cualquier combinación de estas. A diferencia de las terapias de anticuerpos o células T modificadas con CAR o TCR independientes, células T (o cualquier célula según lo descrito anteriormente).

Otra modalidad descrita en la presente descripción es un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad efectiva, p. ej., una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende células T o células NK que expresan TCR o CAR como se describe en la presente descripción. La cantidad y frecuencia de administración se determinará por factores tales como la condición del paciente, y el tipo y la gravedad de la

enfermedad del paciente, aunque las dosificaciones adecuadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

En otras modalidades, se proporcionan métodos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células T modificadas contempladas en la presente descripción o una composición que comprende las mismas, a un paciente que la necesita, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. En ciertas modalidades, las células de la descripción se usan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar un cáncer. Por lo tanto, la presente descripción proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de un cáncer que comprende administrar a un sujeto que necesita de estos una cantidad terapéuticamente efectiva de las células T modificadas de la descripción. Un experto en la técnica reconocería que pueden requerirse múltiples administraciones de las composiciones de la descripción para conseguir la terapia deseada. Por ejemplo, una composición puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 o más veces durante un lapso de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años, o más.

En ciertas modalidades, puede ser deseable administrar células T activadas a un sujeto y luego volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar las células T de esta de acuerdo con la presente descripción, y volver a suministrar al paciente con estas células T activadas y expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo múltiples veces cada cuantas semanas. En ciertas modalidades, las células T pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. Sin limitarse a la teoría, usando este protocolo múltiple de extracción de sangre/múltiples refundido puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de células T.

La administración de las composiciones contempladas en la presente descripción se puede realizar de cualquier manera conveniente, incluso por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. En algunas modalidades, las composiciones se administran por vía parenteral. Las frases

“administración parenteral” y “administradas por vía parenteral”, como se usan en la presente descripción, se refieren a modos de administración que no sean administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluyen, sin limitarse a, inyección e infusión intravascular, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intratumoral, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal. En una modalidad, las composiciones contempladas en la presente descripción se administran a un sujeto mediante inyección directa en un tumor, un ganglio linfático, o un sitio de infección.

En una modalidad, se administra una cantidad efectiva de una composición a un sujeto que necesita de esta para aumentar una respuesta inmunitaria celular a un cáncer en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas por células T citotóxicas capaces de inactivar células infectadas, células T reguladoras y respuestas de células T colaboradoras. También se pueden inducir a las respuestas inmunitarias humanas, mediadas principalmente por células T colaboradoras capaces de activar células B, lo que conduce también a la producción de anticuerpos. Se puede usar una variedad de técnicas para analizar el tipo de respuestas inmunitarias inducidas por las composiciones de la presente descripción, que están bien descritas en la técnica; p. ej., *Current Protocols in Immunology*, editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

En el caso de la inactivación mediada por células T, la unión del CAR–ligando inicia la señalización del CAR a la célula T, lo que resulta en la activación de una variedad de vías de señalización de células T que inducen a la célula T a producir o liberar proteínas capaces de inducir la apoptosis de células diana mediante diversos mecanismos. Estos mecanismos mediados por células T incluyen (pero no se limitan a) la transferencia de gránulos citotóxicos intracelulares de la célula T en la célula diana, secreción de células T de citocinas proinflamatorias que pueden inducir la inactivación

de células diana directamente (o indirectamente a través del reclutamiento de otras células efectoras asesinas), y regulación ascendente de ligandos del receptor de muerte (p. ej., FasL) en la superficie de células T que inducen la apoptosis de la célula diana después de la unión a su receptor de muerte cognado (p. ej., fas) en la célula diana.

En las modalidades de la presente descripción se describe un método para tratar a un sujeto diagnosticado con un cáncer, que comprende eliminar las células T del sujeto, modificar genéticamente dichas células T con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR de unión al GPC3 como se contempla en la presente descripción, lo que produce así una población de células T modificadas, y administrar la población de células T modificadas al mismo sujeto.

En ciertas modalidades, la presente descripción también proporciona métodos para estimular una respuesta del modulador inmunitario mediado por células efectoras a una población de células diana en un sujeto que comprende las etapas de administrar al sujeto una población de células efectoras inmunitarias que expresa un constructo de ácido nucleico que codifica una molécula del CAR de unión al GPC3.

Los métodos para administrar las composiciones celulares descritas en la presente descripción incluyen cualquier método que sea efectiva para dar como resultado la reintroducción de células efectoras inmunitarias diseñadas genéticamente ex vivo que expresan directamente un CAR diseñado genéticamente en el sujeto o en la reintroducción de los progenitores modificados de células efectoras inmunitarias que en la introducción en un sujeto se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras que expresan la molécula del CAR de unión al GPC3. Un método comprende la transducción de células T de sangre periférica ex vivo con un constructo de ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción y devolver las células transducidas al sujeto.

Aunque la descripción anterior se ha descrito en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo a los fines de claridad de comprensión, será fácilmente

evidente para un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta descripción que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones a esta sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se proporcionan solo a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Ejemplos

Ejemplo 1

Anticuerpos anti-GPC3.

Los ratones se inmunizaron con proteína GPC3 para generar hibridomas candidatos. Los hibridomas se probaron para determinar su unión a células diana diferentes. Las células diana usadas en este ejemplo y los ejemplos a continuación se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC) (Hep3B, SkHep1, K562) o Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) (Huh7, JHH5). Estas líneas, con la excepción de las células K562, se cultivaron en medio DMEM (Gibco) o medio William's E, cada uno complementado con 10 % de suero fetal bovino (Corning) y antibióticos de penicilina estreptomicina (Gibco). Las células Hep3B expresan altos niveles de GPC3 humano. Las células negativas Hep3B GPC3 (GPC3KO) fueron genéticamente modificadas a través de CRISPR KO de exón 2 del GPC3 y se seleccionaron clonalmente. La inactivación eficiente del GPC3 y los efectos diana mínimos se verificaron mediante secuenciación y ensayos funcionales. Las células SkHe1 son una línea celular negativa de GPC3. Las células Huh7 tienen una expresión media/baja de GPC3. Las células K562 parentales son negativas para GPC3. Las células positivas K562 para GPC3 se diseñaron genéticamente para sobreexpresar (usando un promotor de EF1a) el GPC3 humano completo (secuencia disponible en Uniport con núm. de ident.: P 51654-1) aunque el lector lentiviral medió la transducción y la selección de resistencia de puromicina. Las proteínas GPC3 de ratón y las

proteínas GPC5 humanas se sobreexpresaron de una manera similar en células K562 como controles para evaluar la selectividad/especificidad del GPC3 humano. Las células K562 se cultivaron en un medio IMDM (Gibco) complementado con 10 % de suero fetal bovino (Corning) y antibióticos de penicilina estreptomicina (Gibco), con o sin puromicina a 1 ug/ml (Sigma). Las células parentales K562, k562-GPC3 y K562-GPC5 se recolectaron como células en suspensión, mientras que las células Hep3B se recolectaron con TrypLE expresan (Gibco), o regulador de disociación celular libre de enzimas (Gibco), según las instrucciones del fabricante.

Para determinar que la unión de los sobrenadantes forman hibridomas, células diana, como se muestra en la Tabla 9, se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo en U y se lavaron en PBS, se incubaron con Bloque Fc (BD Pharmingen), dilución 1:50 del suero humano y reactivo de tinción de células muertas por infrarrojo cercano fijable LIVE/DEAD™ (Invitrogen™) durante 15 minutos, después se lavaron en PBS. Después, las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con el sobrenadante de hibridoma diluido 4 veces en PBS, o el anticuerpo de control (HN3, Genescript; GPC3-PE, ABIN230197, anticuerpo en línea) o PBS. Después de 2 lavados en PBS, todas excepto la condición de anticuerpo conjugado directo se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con un anticuerpo de ratón anticabra secundario conjugado con PE (Jackson ImmunoResearch) diluido 300 veces en PBS. Después de dos lavados finales en PBS, las células se resuspendieron en PBS frío y se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo en un citómetro Fortessa (Becton Dickinson). La Tabla 9 muestra el porcentaje de células vivas de tinción positiva para PE como controlada con base en la tinción negativa con PBS de control. Los aglutinantes se clasificaron por similitud en 3 categorías, aglutinantes de GPC3 parcialmente escindidos, aglutinantes de GPC3 intactos y aglutinantes de células Hep3B solamente.

Tabla 9. Perfiles de unión de hibridomas

	Hibridoma o anticuerpo primario	Porcentaje de células de tinción positiva			
		K562 parental (control)	K562 GPC3+	Hep3B TrypLE	Hep3B CDB
Control negativo	PBS	0,1	0,1	1,5	2,1
Aglutinantes de GPC3 parcialmente escindidos	mAb1	0,8	96,2	73,7	99,2
	HN3	1,9	89,8	50,6	99,5
	mAb2	0,4	94,1	46,8	99,2
	mAb4	0,1	94,1	45,7	99,0
	mAb6	0,1	94,5	49,1	99,4
	mAb7	0,1	94,4	45,8	99,3
	mAb8	0,3	95,1	45,5	99,6
	mAb9	0,4	94,4	46,7	99,6
	mAb11	0,5	93,4	44,2	99,4
	mAb12	8,8	95,9	51,4	99,5
	mAb16	0,2	95,5	46,1	98,6
	mAb17	0,1	94,6	47,8	98,8
Aglutinantes de GPC3 intacto	mAb5	0,1	60,4	3,7	98,0
	mAb10	0,1	56,3	2,8	98,2
	mAb18	0,1	27,3	4,1	21,7
Aglutinantes de HeP3B solamente	mAb3	0,9	2,3	9,7	23,2
	mAb14	0,2	0,6	8,9	19,0
	mAb19	0,3	0,4	7,6	17,8
Control comercial	AbOnline-PE	22,1	92,7	1,8	2,2

Los hibridomas que producen anticuerpos capaces de unirse a los tres tipos de células sin control se seleccionaron para una evaluación adicional. Los dominios variables de las inmunoglobulinas de estos hibridomas se secuenciaron y seis se identificaron como secuencias únicas, el resto es redundante para las seis identificadas como únicas.

Ejemplo 2

Células T con receptor de antígeno quimérico (CAR)

Las secuencias de las regiones variables ligeras y pesadas de los seis pares únicos de cadenas pesadas y ligeras identificadas en el Ejemplo 1 y secuenciación, mAb1, mAb2, mAb10, mAb14, mAb18 y mAb19, se clonaron como fragmentos variables monocatenarios (scFv) en constructos CAR con la siguiente arquitectura; scFv -

dominio bisagra CD8 - dominio transmembrana CD8 - dominio coestimulador de 4 1BB - dominio de señalización de CD3zeta, usando técnicas estándar de biología molecular conocidas en la técnica. Los constructos CAR se clonaron en vectores lentivirales que se usaron para la transducción de células T. Se usó un promotor de EF1A con todos los constructos y se probó. Se evaluaron dos orientaciones diferentes de cadenas pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL), el sufijo “VH” designa un constructo donde VH viene justo después de la señal del péptido, mientras que el sufijo “VL” designa un constructo donde VH viene justo después de un péptido de señal (ver, por ejemplo, la Tabla 10).

Las células T receptoras de antígeno quimérico (CAR) se fabricaron con scFv a base de mAb2, mAb10, mAb1, mAb14, mAb19 y mAb18, junto con constructos de control usando scFv derivados de secuencias de anticuerpo YP7 y codrituzumab disponibles al público. Para la fabricación de células T de CAR, las células T de CD3⁺ se aislaron de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de donantes sanos y se congelaron en un medio de crioconservación celular CryoStor[®] (Sigma Aldrich[®]). Antes de la transducción de lentivirus, las células T de pan CD3 se descongelaron, se dejaron reposar durante dos horas, se activaron con CD3/CD28 de Dynabeads[®] (ThermoFisher Scientific), y después se dejaron reposar durante la noche en medios de células T (X-VIVO[™] (Lonza) con 5 % de suero humano (Valley Biomedical), y Glutamax (Gibco) complementado con 100 IU/ml de interleucina-2 (IL2) (Miltenyi Biotech). Al día siguiente, las células se transdujeron con polibreno y lentivirus que contenían constructos CAR con y sin receptores TGFbeta dominantes negativos (TGFbeta-DNR) como se describe en la presente descripción. Las células se centrifugaron durante 90 minutos a 1000 g, después se colocaron en incubadora. Al siguiente día se reemplazaron los medios de cultivo. Las células se desmoldaron después de dos días, y se expandieron por ocho días. El medio se renovó tres veces por semana con la adición de IL-2 para todo el volumen. Al final de la fabricación, las células se congelaron en un medio de crioconservación celular CryoStor[®](Sigma Aldrich[®]). En toda la

fabricación las células fueron aproximadamente 40-90 % positivas para el transgén medido por citometría de flujo, con un número de copias del vector promedio de aproximadamente 0,5-4. Las células usadas en los ensayos funcionales y los experimentos in vivo descritos a continuación se realizaron después de descongelar y reposar durante la noche con IL2 de 100 US/ml.

Ejemplo 3

Citotoxicidad

La citotoxicidad de las células CAR T fabricadas como se describe en el Ejemplo 2 se evaluó en un ensayo RTCA de xCELLigence en un instrumento MP (Agilent). Se colocaron 10.000 células diana vivas (células Hep3B) en placas el día antes del ensayo, y al día siguiente, 500 células CAR+ T (o no transducidas (UT, por sus siglas en inglés) (para una relación de efector a diana (E:T) de 1: 5 y 1:20) se colocaron en una placa E de 96 pocillos en un medio de cultivo de células diana, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La citotoxicidad se siguió durante 6-7 días usando el software RTCA Pro proporcionado y se reportó como % de citólisis. La Tabla 10 muestra el % de citólisis del criterio de valoración representado contra las células Hep3B a 143 h. Los datos se muestran para 2 donantes, Donante 1 y Donante 2, fabricados como se describe en el Ejemplo 2.

Tabla 10. Determinación de citotoxicidad

T con CAR+: relación de células diana	RELACIÓN E:T 1:5		RELACIÓN E:T 1:20	
	Donante 1	Donante 2	Donante 1	Donante 2
Nombre corto				
mAb2_VH	100,0	100,0	100,0	81,8
mAb10_VH	24,8	52,2	9,5	12,7
mAb1_VH	100,0	100,0	100,0	98,1
mAb14_VH	100,0	100,0	82,4	61,3
mAb19_VH	3,4	1,6	8,8	7,9
mAb18_VH	4,9	1,4	4,2	6,9
mAb2_VL	4,3	3,3	6,7	7,8
mAb10_VL	5,4	3,6	5,5	5,4
mAb19_VL	4,5	3,7	1,8	1,5
mAb18_VL	0,7	1,4	5,8	3,0

hYP7	100,0	100,0	99,9	98,1
Codrituzumab	100,0	100,0	99,9	90,2
No transducida	0,0	0,0	3,6	0,0
Solo células diana	0,0	0,0	0,0	0,0

Todos los constructos CAR se expresaron bien en células T; entre 53-76 % de células T fueron CAR+, con un número de copias de vector promedio entre 0,9-1,6. Las células CAR T y no transducidas fabricadas tenían fenotipos de memoria comparables, excepto las células CAR T a base de mAb14 que tenían marcadores de activación/agotamiento no específicos mayores.

Tabla 11

	% de CAR en el día 14		VCN		% de CD25 en células T CD8+		% de CD39 en células T CD8+		% de CD69 en células T CD8+		% de LAG3+ en células T CD8+		% de PD1 en células T CD8+	
	Donante 1	Donante 2	Donante 1	Donante 2	Donante 1	Donante 2	Donante 1	Donante 2	Donante 1	Donante 2	Donante 1	Donante 2	Donante 1	Donante 2
mAb2_VH	74,3	74,9	1,21	1,62	13,3	10,1	43,7	71,8	9,62	9,38	10,1	10,8	1,05	1,27
mAb10_VH	61,8	60,1	1,16	0,95	10,7	8,76	36	70,4	8,37	8,22	6,29	8,4	0,56	1,09
mAb1_VH	71,6	65,1	1,39	1,31	12,6	6,39	51,4	74,9	7,88	6,21	7	6,07	0,78	1,27
mAb14_VH	62,2	58,6	1,22	1,28	29,7	19,1	58,1	80,9	14,5	14,4	15,7	16,1	0,95	1,44
mAb19_VH	71,3	66,1	0,97	1,02	17,3	11,5	46,7	74,5	9,13	11,8	9,59	12,5	0,79	1,55
mAb18_VH	62,4	58,3	1,26	1,18	9,26	7,68	36	72,2	3,78	7,7	4,03	7,81	0,39	1,36
mAb2_VL	53,8	55,8	1,05	1,24	7,63	3,61	34	63,3	4,93	4,46	3,55	2,82	0,57	1,48
mAb10_VL	75,8	72,1	1,27	1,20	9,82	6,48	38,4	68,4	7,65	7,31	6,98	6,74	0,65	1,06
mAb19_VL	75,2	71,4	1,15	1,05	13,5	8,11	41,7	72,8	10,8	9,93	8,98	7,71	0,99	1,3
mAb18_VL	69,9	67,6	1,44	1,39	7,92	4,11	38,9	68,7	4,76	6,19	3,57	3,58	0,54	1,17
hYP7	69,9	64,3	1,42	1,36	12,7	6,64	50,3	77,1	9	8,41	7,4	7,32	0,62	1,2
Codrituzumab	77	71	1,35	1,50	11,5	7,2	42,1	71,7	11,3	9,42	9,34	9,39	0,99	1,37
No transducida	0,05	0,05	0,00	0,00	6,17	3,98	16,7	42,7	3,67	2,87	2,55	3,34	0,62	2,21

Ejemplo 4

Citotoxicidad de citometría de flujo

La citotoxicidad de las células CAR T se evaluó adicionalmente mediante la citometría de flujo. La citotoxicidad se midió al final del ensayo por % de células diana muertas (Hep3B, JHH5, K562-GPC3 de ratón, K562-GPC5 humano, K562 parental y SKHep1). El ensayo se realizó con células T provenientes de 2 donantes sanos fabricado como se describe en el Ejemplo 2. Para este ensayo, se colocaron en placas 100.000 células diana teñidas con CellTrace violeta y 100.000 células CAR+ T (o células no transducidas (NTD, por sus siglas en inglés) en una placa de 96 pocillos de fondo en U y en un medio de cultivo de células diana. Después de 48 h, los cocultivos se lavaron y se tiñeron con una tinción de panel de anticuerpos para determinar su viabilidad (Live/Dead Cerca Infra-Red Invitrogen™), y los marcadores de células T CD3-BV786, CD8-FITC, CD69-PECy7 (Biolegend), Myc-AF647 (Cell Signaling), y se adquirieron muestras en un citómetro de flujo iQue (Intellicyt). La citotoxicidad se midió como % de dianas muertas evaluadas por % de células vivas/muertas-altas en células negativas de CD3 positivas para violeta de CellTrace. Los CAR basados en mAb14 tenían actividad citotóxica contra la célula diana negativa de GPC3, Sk-Hep1 (ver la Tabla 11). Además, los CAR basados en mAb19_VL, YP 7 y codrituzumab tenían actividad citotóxica contra las células diana K562 que sobreexpresan GPC5 humano (ver la Tabla 12). Por el contrario, los CAR basados en mAb2 y mAb1 no tuvieron niveles similares de citotoxicidad contra las células diana Sk-Hep1 o K562 que sobreexpresan GPC5 humano. Los CAR basados en mAb1 y mAb2 se seleccionaron para una evaluación adicional.

Tabla 12. Determinación de citotoxicidad

	Donante 1						Donante 2					
Nombre corto	Hep3B	JHH5	K562 - GPC3 de ratón	K562 - GPC5 humano	K562 parental	SkHep1	Hep3B	JHH5	K562 - GPC3 de ratón	K562 - GPC5 humano	K562 parental	SkHep1
mAb2_VH	87,5	74,2	79,5	26,2	13,3	29	72,9	65,2	88,5	25,2	13,5	26,5
mAb10_VH	84,3	38,6	33,1	25,5	15,2	28,1	77	41,2	49,8	29,7	15,6	27,2
mAb1_VH	88,8	70,5	80,4	23,4	13,9	23,8	75,6	72,3	87,8	25,3	13	29,7
mAb14_VH	85,7	27,9	29,2	29,6	18,8	82,9	78,5	26	31,9	34,1	19,2	73,1
mAb19_VH	41,8	24,6	19,3	23,6	12,9	23,7	51,1	19,4	25,6	27,1	14,7	28,1
mAb18_VH	39,8	22,8	21,3	24	14,6	24,3	49,8	22,3	28,6	29,4	16,3	23
mAb2_VL	85,2	47	29,2	24,8	14,6	32,1	81,5	43,8	31	26,9	13,6	22,8
mAb10_VL	61	33,5	26,5	23,9	14,4	24,9	69,6	32,9	29,8	25,1	13,4	23,8
mAb19_VL	69,2	40,2	38,2	38,8	31,8	22,4	74,5	45,4	69,7	69,8	28	38,8
mAb18_VL	41,5	21,5	18,7	22,1	11,6	23,4	38,4	19,6	21,3	23,3	13	21,7
hYP7	88,9	83	63,6	64,5	13,4	23,8	89,5	81	68,1	71,2	15,1	26
Codrituz	90	90,6	22,3	94,6	12,4	27	90,7	72,6	24,8	95,1	13,9	22,2

Ejemplo 5

Citotoxicidad de los CAR humanizados

Las versiones humanizadas de scFv de mAb2 y mAb1 se construyeron cada una mediante la clonación de las CDR de cada mAb en regiones de marco humano seleccionadas para homología con la secuencia murina parental. Se realizaron versiones humanizadas adicionales mediante reversión de aminoácidos selectos a sus contrapartes marinas. Los 10 scFv humanizados resultantes se clonaron en vectores lentivirales que contienen constructos CAR, como se describe en el Ejemplo 1. Después, los constructos CAR basados en mAb2-1-mAb2-5 y mAb1-1-mAb1-5 humanizado se probaron funcionalmente *in vitro* en cocultivo con células diana que expresan GPC3. Las células CAR T que incluyen el mAb2-1-mAb2-5 y los constructos CAR basados en mAb1-1- mAb-1-5 se fabricaron como se describe en el Ejemplo 2.

La citotoxicidad de estas células CAR T se evaluó en un ensayo RTCA de xCELLigence en un instrumento MP (Agilent). Se colocaron 10.000 células diana vivas (células Hep3B) en placas el día antes del ensayo, y al día siguiente, 500 o 2000 células CAR+ T (o no transducidas (UT) (para una relación de efector a diana (E:T) de 1:20 o 1:5 respectivamente) se colocaron en una placa E de 96 pocillos en un medio de cultivo de células diana, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La citotoxicidad se siguió durante 6-7 días usando el software RTCA Pro proporcionado y se reportó como % de citólisis. La Tabla 13 muestra el % de citólisis del criterio de valoración representado contra las células Hep3B a 164h. Los datos se muestran para 2 donantes, Donante 1 y Donante 2. Como se muestra en la Tabla 12, la familia mAb1 (mAb1 parental y mAb1-1 a mAb1-5 humanizado) de las células CAR T tuvieron una citólisis específica más alta que la familia mAb2 de los CAR.

Tabla 13, Determinación de citotoxicidad

Número de células diana sembradas	10.000	10.000
Célula diana	Hep3B	SkHep1

Número de células (CAR) T añadidas	500				2000			
Células T de donante	DONANTE 1		DONANTE 2		DONANTE 1		DONANTE 2	
Nombre corto	% de citólisis	DE	% de citólisis	DE	% de citólisis	DE	% de citólisis	DE
hmAb2-1	36,2	5,2	0,0	5,5	4,8	4,1	9,2	12,6
hmAb2-2	28,9	6,8	0,0	3,5	0,0	6,1	12,5	3,6
hmAb2-3	19,3	11,7	0,0	8,7	0,0	5,1	6,8	4,8
hmAb2-4	29,3	3,9	0,0	0,7	0,0	2,7	5,9	7,2
hmAb2-5	29,6	5,2	0,0	14,2	0,0	5,8	5,7	1,2
hmAb1-2	95,7	2,9	91,3	4,8	0,0	3,7	3,4	4,5
hmAb1-3	97,1	0,1	89,4	4,7	0,0	7,3	9,9	3,7
hmAb1-1	96,4	2,1	93,4	4,7	0,0	5,5	5,1	8,3
hmAb1-4	94,9	1,4	89,6	10,5	0,0	2,3	3,0	7,3
hmAb1-5	99,3	1,3	95,0	2,6	0,0	5,7	5,7	6,4
mmAb2	81,1	5,2	71,0	8,8	0,0	2,8	5,6	15,6
mmAb1	96,1	1,5	86,7	0,7	0,0	5,6	0,0	13,3
hYP7	86,2	16,8	46,9	10,0	0,0	0,2	0,3	8,1
NTD	0,0	12,5	0,0	4,8	0,0	5,5	0,0	10,0

Ejemplo 6

Citotoxicidad de la citometría de flujo de CAR humanizados

La citotoxicidad de las células CAR T humanizados se evaluó adicionalmente mediante una citometría de flujo. La citotoxicidad se midió al final del ensayo por % de células diana muertas (Hep3B, JHH5, K562-GPC3 de ratón, K562-GPC5 humano, K562 parental y SKHep1). Las células CAR T se fabricaron como se describe en el Ejemplo 2. Para este ensayo, se colocaron en placas 100.000 células diana teñidas con CellTrace violeta y 100.000 células CAR+ T (o células no transducidas (NTD, por sus siglas en inglés) en una placa de 96 pocillos de fondo en U y en un medio de cultivo de células diana. Después de 48 h, los cocultivos se lavaron y se tiñeron con una tinción de panel de anticuerpos para determinar su viabilidad (Live/Dead Cerca Infra-Red) y los marcadores de células T CD3-BV786, CD8-FITC, CD69-PECy7 (Biolegend), Myc-AF647 (Cell Signaling), y se adquirieron

muestras en un citómetro de flujo iQue (Intellicyt). La citotoxicidad se midió como % de dianas muertas evaluadas por % de células vivas/muertas-altas en células negativas de CD3 positivas violeta de CellTrace. Como se muestra en la Tabla 14, el ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo confirmó que las células CAR T de hmAb1 humanizadas eran más citotóxicas que las células CAR T basadas en mAb2 humanizado contra las células diana Hep3B y JHH5. Además, se observó que las células CAR T basadas en hmAb1 fueron más específicas que las células CAR T basadas en YP7, las cuales muestran una ligera reactividad a GPC5 mAb1 se seleccionó para una evaluación adicional.

Tabla 14. Determinación de citotoxicidad

Nombre corto	Hep3B	JHH5	K562 2353-GPC3 de ratón	K562 2355-GPC5 humano	K562 parental	SkHep1
hmAb2-1	65,8	28,9	24,2	16,2	26,0	27,1
hmAb2-2	70,8	41,3	23,6	16,9	25,2	31,0
hmAb2-3	75,9	35,8	21,6	16,6	27,5	27,6
hmAb2-4	73,7	47,1	22,5	17,3	28,4	30,3
hmAb2-5	71,7	46,1	25,5	15,3	29,3	30,0
hmAb1-2	89,4	75,7	48,3	18,2	35,3	32,0
hmAb1-3	89,9	72,6	50,5	16,3	27,4	28,9
hmAb1-1	91,1	76,6	53,9	17,7	30,6	33,8
hmAb1-4	89,8	73,4	52,7	16,4	29,1	27,3
hmAb1-5	90,5	76,7	52,9	18,5	30,4	33,4
mmAb2	86,7	68,2	48,5	15,2	26,2	30,1
mmAb1	89,1	72,0	50,7	17,9	30,6	45,8
hYP7	75,2	75,8	28,3	42,2	27,7	29,4
NTD	37,0	17,9	15,3	14,3	22,8	17,6
Tumores solo	20,0	9,0	13,8	13,1	17,7	13,3

Ejemplo 7

Evaluación in vivo

Las células T transducidas con diversos constructos de CAR o no transducidos (UT), como se muestra en las Tablas 15A-15C y 16, se fabricaron como se describió anteriormente y se evaluaron in vivo en un modelo de xenoinjerto Hep3B en ratones NSG. Se resuspendieron 2×10^6 células Hep3B en Matrigel al 25 % y se implantaron

en la axila alta de ratones NSG el día 0. Cada tres a cuatro días después se midió el volumen del tumor usando calibres basados en la longitud y el ancho del tumor. El día 14, cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de $\sim 150 \text{ mm}^3$, los animales se dividieron en grupos de 8 ratones (4 para control de vehículo), de tal manera que los volúmenes tumorales promedio fueron comparables entre los grupos, y se trataron con un vehículo PBS, o células T no transducidas, o células CAR T GPC3, a 1×10^6 de células CAR+ T vía inyección intravenosa. La infusión de células T se normalizó con la adición de células no transducidas, de tal manera que la dosis total de células T fue igual entre todos los grupos. El porcentaje de respuesta completa se calculó dividiendo la cantidad de ratones en los que el volumen tumoral se disminuyó a 0 durante dos o más puntos temporales consecutivos, entre la cantidad de ratones del grupo. En el modelo de ratón con xenoinjerto Hep3B subcutáneo, el CAR mAb1-1 humanizado fue más potente que otros CAR que incluyen CAR basados en mAb2, ya que fue capaz de disminuir el volumen tumoral (Tablas 15A-15C) y producir respuestas más completas que otros CAR probados (Tabla 16).

Tabla 15A. Controles de tratamiento

	Tratamiento con vehículo (PBS)				Tratamiento con células T no transducidas							
Días posteriores al tumor	Volumen tumoral (mm^3)				Volumen tumoral (mm^3)							
14	108	126	126	196	196	108	172	196	126	108	108	126
15	126	126	126	196	196	108	196	288	126	172	108	221
18	245	320	288	446	320	172	245	446	288	365	256	320
20	486	550	550	650	650	320	527	936	446	500	365	446
22	527	787	666	787	1008	405	787	1183	650	550	500	600
25	847	1268	1099	1008	1268	726	936	1470	1008	1099	864	1008
27	908	1470	1372	1352	1688	936	1008	1470	1268	1268	1099	1268
29	1224	1470	1688	1437	1800	1008	1080		1268	1568	1099	1268
32	2025	1800	2746	2025	2432	1470				2025	1470	2304
34		2176				2176					2304	

Tabla 15B. Grupos de tratamiento

	Tratamiento con células CAR T 1e6 YP7								Tratamiento con células CAR T 1e6 mAb1-1							
Días posteriores al tumor	Volumen tumoral (mm ³)								Volumen tumoral (mm ³)							
14	196	126	88	196	126	126	126	108	126	196	196	126	108	108	88	172
15	288	144	88	320	126	172	221	172	320	288	320	126	108	108	126	172
18	666	320	172	600	446	288	446	405	550	486	527	288	288	126	172	256
20	864	446	256	787	650	405	600	600	600	787	650	550	365	196	256	256
22	1183	600	500	1268	1080	600	787	787	600	847	908	600	550	288	405	405
25	864	221	75	650	446	126	288	365	787	1008	847	600		320	405	288
27	726	75	0	527	320	0	126	172	787	1268	847	600		221	256	108
29	936	0	0	384	108	0	108	108	787	1268	1268	288		196	196	75
32	936	0	0	384	0	0	108	63	1183	1666	1568	550		108	196	0
34	1268	0	0	700	0	0	172	63	1666	2025	2025	936		75	196	0
36	1568	0	0	700	0	0	172	63	1764			936		0	196	0
39	2176	0	0	847	0	0	256	196	2560			1470		0	108	0
41		0	0	908	0	0	256	288				1688		0	0	0
43		0	0	650	0	0	288	288				1800		0	0	0
46		100	0	446	0	88	405	288				2457		0	0	0
49		113	0	446	0	126	405	288						0	0	0
53		198	75	221	0	352	666	405						126	63	88
55		416	144	75	0	600	666	550						126	108	144
57		750	144	126	0	787	864	550						221	126	162
60		1224	320	172	0	787	1099	787						320	196	162
62		1521	405	172	0	1008	1183	936						352	221	270
64		1960	550	172	0	1268	1372	1183						384	288	384
67		2138	787	196	0	1568	1470	1568						700	405	567
69			1268	221	0	1764	1568	2176						847	550	800
71			1688	320	0	2432	2176							1470	787	1089
74			1913	320	0									1568	1008	1521

Tabla 15C. Grupos de tratamiento

	Tratamiento con células CAR T 1e6 mAb1-5								Tratamiento con células CAR T 1e6 mAb2							
Días posteriores al tumor	Volumen tumoral (mm ³)								Volumen tumoral (mm ³)							
14	196	108	144	196	88	108	144	108	196	126	126	126	196	108	144	144
15	288	126	196	320	144	172	288	108	288	196	126	126	288	126	221	288
18	550	256	405	650	446	256	600	172	600	288	126	288	550	256	352	550
20	864	288	600	700	550	288	787	256	650	288	172	405	550	365	486	666

22	1372	550	864	1152	726	405	1008	256	1008	405	256	600	787	550	650	864
25	1372	600	864	1224	787	500	1183	365	1008	446	256	650	1008	666	787	1183
27	2048	650	1008	1764	847	666	1372	550	1183	446	365	787	1268	936	1352	1183
29		847	1470	2025	1080	864	1800	726	1352	600	550	1183	1568	1183		1800
32		1080			1268	1099	2176	1099	1666	787	864	1568	1800	1372		2457
34		1352			2048	2048		1372	2304	1008	1099	2176	2176	2048		
36		1568						1688		1268	1372					
39		2250						2457			2176					

Tabla 16

	% de respuesta completa
Tratamiento con vehículo (PBS)	0
Tratamiento con células T no transducidas	0
Tratamiento con células CAR T 1e6 YP7	50
Tratamiento con células CAR T 1e6 mAb1-1	37,5
Tratamiento con células CAR T 1e6 mAb1-5	0
Tratamiento con células CAR T 1e6 mAb2	0

Ejemplo 8

Receptor negativo dominante de TGFbeta de CAR T+

Los constructos de vectores lentivirales se diseñaron genéticamente para sobreexpresar, además del CAR, una versión truncada del receptor 2 TGFbeta que no posee el dominio de señalización interna y actúa como un receptor de TGFbeta negativo dominante y se denomina TGFbDNR2. Los constructos CAR basados en mAb1-1 y YP7 se probaron con esta mejora de TGFbDNR2. La fabricación de células CAR T se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2. Los constructos CAR T expresados bien en las células T (entre 60 y 86 % de células T CD3+ fueron CAR+ al final de la fabricación; con valores del número de copias del vector entre 0,8 y 2). (ver la Tabla 17).

Tabla 17

	% de CAR+	Número de copias de vectores
mAb1-1_DNR2	86	2,03
hYP7_DNR2	60,3	0,79
UTD	0,6	0

Se evaluó la citotoxicidad específica en un ensayo xCELLigence contra las células diana que expresan diferentes niveles de GPC3, que incluyen 2 líneas de células que fueron negativas para GPC3 como se describe en el Ejemplo 2. Las células CAR T exhibieron citotoxicidad contra Hep3B y Huh7 de objetivos que expresan GPC3. Se encontró que el mAb1-1 era más específico que el CAR basado en YP7 ya que tenía citólisis mínima contra las células diana negativas para GPC3 Hep3B-GPC3KO y Sk-Hep1 (Tabla 18).

Tabla 18. Citotoxicidad

Efectores: Relación diana	E:T alta				E:T baja			
Número de células diana sembradas	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
Célula diana	Hep3B	Huh7	Hep3B GPC3KO	Sk-Hep1	Hep3B	Huh7	Hep3B GPC3KO	Sk-Hep1
Número de células (CAR) T añadidas	1000	10.000	10.000	10.000	500	500	500	500
Nombre corto	% de citólisis							
mAb1-1_DNR2	100	100	10	1	99	44	0	0
hYP7_DNR2	100	100	100	100	100	31	95	3
No transducidas	4	0	9	0	2	0	2	0
Diana	0	0	0	0	0	0	0	0

Ejemplo 9

Receptor negativo dominante de TGFbeta de CAR T+

La secreción de citocinas mediante células CAR T específicas de GPC3 mejoradas por TGFbDNR se evaluó después de un ensayo de cocultivo. Se colocaron en placas 25.000 células diana y 25.000 células CAR+ T o no transducidas (UTD en una placa de 96 pocillos de fondo plano y en un medio de cultivo de células diana. Después de 24 h, se recolectaron los sobrenadantes, se diluyeron 50 o 2 veces, y se midió IFN γ mediante la plataforma Luminex y el kit Milliplex MAP (EMD Millipore Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células Hep3B expresan GPC3 humano, mientras que Hep3B-GPC3KO son GPC3 negativos. Las “solamente células T” de control es un control donde no hubo diana presente. Se realizó el experimento con células provenientes de 1 donante sano. Como se

muestra en la Tabla 19, la concentración de IFN γ se reportó en pg/ml. Se encontró que el CAR de mAb1-1_DNR era más específico que el CAR basado en YP7_DNR ya que tenía menos secreción de IFN γ contra las células diana negativas para GPC3 Hep3B-GPC3KO y en ausencia de dianas.

Tabla 19

Nombre corto	Hep3B			Hep3B-GPC3KO			Solamente células T		
UTD	30,5	30,5	30,5	30,5	30,5	30,5	7,5	7,8	8,1
mAb1-1_DNR	37.710,3	39.360,6	44.536,0	59,2	30,5	30,5	38,6	30,6	45,5
hYP7_DNR	120.842,8	105.712,5	101.816,5	77.435,0	72.569,6	66.045,7	9805,2	9794,2	9903,2

Ejemplo 10

Receptor negativo dominante de TGF β de CAR T+ *in vivo*

Las células T transducidas con el constructo de CAR basadas en mAb1-1_TGF β DNR o no transducidas (UT), se produjeron a partir de leucaféresis de 3 donantes sanos. Las células T se evaluaron después en un modelo de ratón con xenoinjerto Hep3B subcutáneo como se describe en el Ejemplo 7: día 19 después del implante tumoral para el donante 1, día 17 después del implante tumoral para los donantes 2 y 3; Dosis de células CAR T: 2e6/ratón para el donante 1, o 1e6/ratón para los donantes 2 y 3; y dosis de la célula UT: 5e6/ratón para el donante 1, 4e6/ratón para el donante 2.

El seguimiento del volumen tumoral (Tabla 20 para el donante 1 y Tabla 21 para los donantes 2-3) muestra que las células CAR T mAb1-1-DNR fueron capaces de controlar eficientemente el crecimiento tumoral a dosis bajas (células CAR T 2e6 o 1e6/ratón).

Tabla 20

	Tratamiento con células T 5e6 UT-donante 1										Tratamiento con células CAR T 2e6 mAb1-1-DNR - donante 1									
Días posteriores al tumor	Volumen tumoral (mm3)										Volumen tumoral (mm3)									
14	107	207	108	138	123	189	149	86	120	82	117	127	106	125	183	135	115	87	108	151
21	219	423	197	268	263	420	159	368	309	188	213	251	192	252	424	390	351	181	223	438
27	693	904	449	559	464	1036	849	295	619	400	200	198	362	311	580	600	252	186	295	547
30	868	1297	716	863	761	1350	982	472	861	725	170	96	133	256	610	497	150	40	274	448
34	1098	1934	986	1295	1108	1764	1421	693	1111	926	67	0	65	144	428	337	83	18	174	187
38	1600	2491	1263	1583	1495	2059	1652	878	1324	1205	79	8	51	80	531	271	63	18	174	121
42	2149		1558	2263	2026	2578	2306	1086	2176	2158	39	14	23	77	570	112	20	0	113	73
45			2123					1459			36	0	18	63	453	144	0	0	113	68
52								1495			0	0	0	108	274	141	0	0	0	75
56											0	0	0	126	172	150	0	0	0	0
59											0	0	0	0	63	144	0	0	0	0

Tabla 21

	Tratamiento con células T 4e6 UT -donante 2								Tratamiento con células CAR T 1e6 mAb1-1-DNR –donante 2								Tratamiento con células CAR T 1e6 mAb1-1-DNR –donante 3							
Días posteriores al tumor	Volumen tumoral (mm3)								Volumen tumoral (mm3)								Volumen tumoral (mm3)							
16	72	76	79	91	93	113	116	188	72	76	81	89	96	110	121	169	74	75	83	86	99	108	131	151
22	95	176	104	133	284	190	242	293	63	170	174	239	239	191	290	226	136	169	129	252	291	348	217	286
28	144	303	204	329	425	474	737	852	51	214	277	235	318	559	436	328	243	224	366	364	667	492	368	468
31	265	587	327	481	753	767	856	1144	0	155	250	145	290	419	392	396	256	492	363	458	757	215	436	459
35	426	816	392	814	1252	888	1136	1423	0	188	108	0	172	420	363	389	298	173	228	210	984	139	334	266

39	729	1330	538	1229	1885	1099	1159	2138	0	250	165	0	172	588	544	414	69	256	83	186	1498	83	415	314
42	1000	1570	709	1637	2312	1375	1283		0	237	229	0	243	545	564	451	163	263	63	83	1800	63	500	442
49									0	315	88	0	117	259	325	231	359	484	0	108		63	857	552
52									0	410	86	0	131	352	256	340	510	795	0	172		63	1022	805
56									0	337	18	0	65	86	112	70	598	932	0	0		69	1197	1051
58									14	285	14	0	63	81	86	69			0	172		93		
62									0	225	0	0	0	0	72	85			0	194		227		
66									0	262	0	0	0		0	63			81	451		438		

Ejemplo 11

Receptor negativo dominante de TGFbeta de CAR T+ en un modelo in vivo con bajo nivel de GPC3

Se produjeron células T transducidas con el constructo de CAR basadas en mAb1-1_TGFbDNR o no transducidas (UT). Las células T se evaluaron después en un modelo de ratón con xenoinjerto Huh7 subcutáneo. Brevemente, las células tumorales 5e6 Huh7 se prepararon con Matrigel al 50 % y se implantaron el día 0 en el flanco dorsal de ratones NSG MHC_I y MHC-II con doble desactivado. El día 10, los ratones con volumen tumoral entre 63 y 110 mm³ se inscribieron y se distribuyeron en grupos, de tal manera que el volumen tumoral promedio en la dosificación de células T sería de 80 mm³. El día 10, los ratones recibieron un total de 1,57e7 de células T/ratón totales, y en ratón tratado con CAR T, esto representó células CAR T 1e7/ratón. También se siguió un grupo de control en el que los ratones recibieron PBS como control de vehículo.

El seguimiento del volumen tumoral (Tabla 22) muestra que las células CAR T de mAb1-1-DNR fueron capaces de controlar eficientemente el crecimiento tumoral de células tumorales de expresión baja de GPC3.

Tabla 22

	Tratamiento con PBS									Tratamiento con células UT coincidentes 1e7									Tratamiento con células CAR T 1e7 mAb1-1-DNR									
Días posteriores al tumor	Volumen tumoral (mm3)									Volumen tumoral (mm3)									Volumen tumoral (mm3)									
	7	70	70	70	71	71	71	72	72	73	73	73	74	74	74	75	76	77	77	79	80	82	83	83	83	85	88	90
14	85	70	218	111	86	111	63	70	93	108	83	72	76	131	83	63	108	205	307	154	175	203	130	127	398	189	120	144
19	141	63	699	578	91	411	83	135	174	235	129	108	91	411	117	69	99	397	499	300	262	225	275	137	573	426	141	403
21	256	75	868	721	74	292	186	261	319	396	295	183	118	717	186	108	127	598	677	350	270	267	377	196	660	432	164	449
25	776	224	1631	1423	138	613	441	515	578	518	599	519	548	969	405	219	318	1194	1310	198	281	180	211	137	609	286	144	230
30	1244	448	2378	2712	325	837	565	875	796	877	1081	1027	671	1932	598	387	596	1309	1719	63	176	63	108	108	278	147	75	113
33	1507	745			604	1088	614	1160	1185	1298	1476	1349	926		818	624	819	1621	2282	36	109	0	63	36	174	146	51	75
35	2304	1310			1016	1569	1183	1468	1856	1470	1806	1913	1186		1105	1028	1407	2016		32	0	0	0	18	137	282	63	63
39					1435	1684	1524	1738	1906	2772		1963	1783		1549	1430	1704			0	115	0	63	137	126	473	108	108
43					1724	2377	2202	2721												0	211	0	108	324	207	824	139	137
47																				0	172	0	119	458	219	1195	173	213
50																				0	108	0	224	832	460	1367	200	321

Ejemplo 12

Mapeo de epítomos para mAb1-1

El epítopo para mAb1-1 se determinó mediante análisis espectrométricos de masa (MS, por sus siglas en inglés) de desorción/ionización por láser asistida por matriz de alta masa (MALDI, por sus siglas en inglés). Brevemente, se analizó el recombinante, el GPC3 humano (rhGPC3) y un fragmento variable monocatenario fusionado a un dominio de cristizable de fragmento de IgG2A murina (scFv-Fc) individualmente mediante espectrometría de MALDI de alta masa usando un espectrómetro de masas Autoflex II MALDI tiempo de vuelo (ToF, por sus siglas en inglés) ToF (Bruker) con un detector especializado diseñado para detectar complejos moleculares grandes con alta sensibilidad. Las muestras se diluyeron y mezclaron 1:1 con matriz de ácido sinapínico (10 mg/ml) en acetonitrilo:agua (1:1, v/v), TFA 0,1 % (kit de MALDI de K200) y se colocaron en una placa de MALDI (SCOUT 384). Después de la cristalización a temperatura ambiente, la muestra se introdujo en el espectrómetro analizado.--

Se mezclaron el scFv de RhGPC3 y mAb1-1 con un gran exceso molar del scFv al GPC3 y después se reticularon con una mezcla de agentes de reticulación química. Las muestras se incubaron durante 3 horas con el reactivo de reticulación. Las muestras reticuladas se prepararon como se indicó anteriormente y se caracterizaron por MALDI MS de alta masa.

A continuación, rhGPC3 se digirió usando un grupo de proteasas (es decir, tripsina, quimotripsina, asp-N, elastasa y termolisina) y se analizó por análisis de nLC-LTQ-Orbitrap MS/MS. Los péptidos resultantes se analizaron. Finalmente, el complejo rhGP3-scFv-Fc se sometió a escisión multienzimática mediante el mismo conjunto de proteasas y se analizó mediante cromatografía de masas de alta resolución y espectrometría de masas (nLC-LTQ-Orbitrap MS). Se identificaron nueve péptidos reticulados entre rhGPC3 y el mAb1-1 scFv-Fc, que indicó que el mAb1-1 se une a un epítopo en rhGPC3, que incluye los aminoácidos Thr55, lys68, ser74, arg75, lys80, thr84, arg258, y Ser263, donde las posiciones de aminoácidos se numeran como en

la base de datos UniProt para la entrada Q8IYG2 (Q8IYG2_HUMAN) (Consorcio de UniProt, 2021)

Ejemplo 13

Medición de la afinidad de mAb1-1 GPC3

Una constante cinética para la unión de mAb1-1 scFv mFc a su objetivo, gPC3, se determinó usando un equipo Sartorius Octet Red96 con biosensores AMC. Se diluyó mAb1-1 scFv-Fc a 2 ug/ml y se capturó en 7 puntas de biosensor AMC bajo agitación. Se dejó en blanco un biosensor como referencia. Se usaron como analitos dos lotes de humano recombinante GPC3(Q25-H559)-6xHis (rhGPC3) a 464,3, 154,8, 51,59, 17,2, 5,73, 1,911 y 0 nM La fase de asociación se midió durante 90 segundos y la disociación se midió durante 120 segundos. Todas las mediciones se corrigieron para la desviación inicial al restar un sensor de control expuesto a un amortiguador de corriente solamente Los datos se analizaron usando un modelo de interacción 1:1 con ajuste global para cada lote de analito por separado, usando el software de análisis Octet.

Para el ensayo de YP7 scFv mFc, se capturó el YP7 scFv mFc en una única punta del biosensor AMC y se evaluó la unión a rhGPC3 a una única concentración de 500 nM. La fase de asociación se midió durante 90 segundos y la disociación se midió durante 120 segundos. Se analizaron los datos para YP7 usando un modelo de interacción 1:1, usando un ajuste individual para la concentración única. -

Se determinó que los valores KD de mAb1-1 scFv-Fc para los lotes 1 y 2 de rhGPC3 eran 32,7 y 35,2 nM, respectivamente. Si bien estos valores muestran buena reproducibilidad, el ajuste indicó que puede haber cierta unión compleja en la interacción medida. A partir de una única concentración de analito, el valor KD de YP7 a rhGPC3 fue de 8,73 nM.

Tabla 23

scFv-Fc	rhGPC3	K _D (nM)	K _{activo} (1/MS)	K _{inactivo} (1/s)
mAb1-1	Lote 1	32,7	2,18 E+05	7,12 E-03
	Lote 2	35,2	2,23 E+05	7,85 E-03

YP7	Lote 2	8,73	7,73 E+04	6,75 E-04
-----	--------	------	-----------	-----------

Ejemplo 14

Unión de mAb1-1 e YP7 a proteínas fuera del objetivo expresadas en membrana plasmática

El mAb1-1 y YP7 scFv-Fc se analizaron para determinar la unión a una genoteca de proteínas de membrana plasmática expresadas individualmente en células HEK293. Las células HEK293 se transfectaron de forma inversa por duplicado en portaobjetos de micromatrices manchados con vectores de expresión que codifican ZsGreen seguido de una de las 5484 proteínas de membrana plasmática humana o proteínas secretadas conectadas en la superficie celular. Se formaron matrices de portaobjetos adicionales con vectores que codifican 371 heterodímeros. Como control positivo para asegurar que se logró el nivel mínimo de transfección, cada portaobjetos incluyó células transfectadas inversamente con hEGFR-IRES-ZsGreen1 por cuadruplicado. Las micromatrices se unieron y se tiñeron con los scFv y el anti-EGFR y la unión se detectó con un anticuerpo secundario fluorescente. Los aciertos primarios identificados en el cribado inicial se confirmaron en un cribado secundario junto con controles adicionales; Los vectores que codifican las coincidencias primarias se volvieron a disponer y se expresaron en células HEK293 en portaobjetos nuevos y se realizó el cribado en células fijas y no fijadas. Se detectó una unión media a fuerte a GPC3 para ambos objetivos. Se detectó y confirmó la unión débil fuera del objetivo de YP7 a CSPG5 (isoformas 1 y 2). Una unión débil fuera del objetivo de mAb1-1 a CDH1 se detectó y se confirmó en el cribado secundario y mediante análisis de citometría de flujo de células HEK293 transfectadas.

Tabla 24

Muestra	Ident. de gen	Análisis primario (células fijas)		Análisis de confirmación (células fijas)		Análisis de confirmación (células vivas)
		Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	
mAb1-1	GPC3	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte

(2 ug/ml)	CDH1	Muy débil	Muy débil	Débil	Débil	Débil
YP7 (10 ug/ml)	GPC3	Fuerte	Med./Fuerte	Med./Fuerte	Med./Fuerte	N/A
	CSPG5 (isoforma 1)	Débil	Débil	Débil	Débil	N/A
	CSPG5 (isoforma 2)	Débil	Débil/Med	Débil	Débil/Med	N/A

Ejemplo 15

Reactividad cruzada del mAb1-1 con tejidos humanos normales

Los métodos se desarrollaron para detectar la tinción específica de tejidos que expresan GPC3 con mAb1-1 scFv-Fc (artículo de prueba) usando células de placenta humana crioseccionada, huh7 y Hep3B como controles positivos y células SK-HEP1 como control negativo. La unión del mAb1-1 a un panel de tejidos humanos normales se evaluó después en criosecciones de al menos 3 donantes a dos concentraciones. Los controles negativos incluyeron IgG2a monoclonal de ratón de diferente especificidad (artículo de control), así como una condición sin reactivo de tinción (control del ensayo). Como control positivo, los tejidos se tiñeron con un anticuerpo policlonal de conejo que se une a la β_2 -microglobulina (validación de tejido). La Tabla 25 resume los resultados. El mAb1-1 no se une a las membranas celulares en tejidos sanos normales excepto para las células epiteliales de la mucosa basal en el estómago donde se ha informado la expresión de GPC3.

Tabla 25

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Material de control positivo									
Criosecciones de células Hep3B	CM1543-1	1,2,4	1-3+ (frec.)	1-3+ (frec.)	Neg.	Neg.	Neg.	NS	Tinción de membrana y citoplasmática de débil a fuerte de células Hep3B de control positivo frecuentes con ambas concentraciones de GS-1138451. No hay tinción de células de control positivo con ninguna concentración de MslgG2a o en los portaobjetos de control del ensayo.
Material de control negativo									
Criosecciones de células SK-HEP-1	CM1545-1	1,2,4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NS	No hay tinción de células SK-HEP-1 de control negativo con ninguna concentración de GS-1138451 o MslgG2a o en los portaobjetos de control del ensayo.
Material de control auxiliar									

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Criosecciones de placenta humana (trofoblastos)	HT2652-1	1,2,4	1-3+ (ocas.)	1-2+ (raramente ocas.)	Neg.	Neg.	Neg.	NS	Tinción de membrana y citoplasmática de débil a fuerte de trofoblastos ocasionales con 2 µg/ml de GS-1138451. La tinción se redujo de débil a moderada y de rara a ocasional con 0,5 µg/ml de GS-1138451. No hay tinción de ningún elemento de tejido de la placenta humana con ninguna concentración de MslgG2a o en los portaobjetos de control del ensayo.
Criosecciones de células Huh-7	CM1544-1	1,2,4	1-3+ (frec.)	1-3+ (ocas. a frec.)	Neg.	Neg.	Neg.	NS	Tinción de membrana y citoplasmática de débil a fuerte de células Huh-7 frecuentes con 2 µg/m GS-1138451. La frecuencia de tinción se redujo de ocasional a frecuente con 0,5 µg/ml de GS-1138451. No hay tinción de células Huh-7 con ninguna concentración de MslgG2a o en los portaobjetos de control del ensayo.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
									Comentarios generales: Todas las muestras de tejido se consideran adecuadas para la interpretación a menos que se indique lo contrario. Tinción de fondo debido a la mieloperoxidasa endógena incompletamente inactivada o pigmentos endógenos/exógenos descritos para tejidos individuales. Los portaobjetos se numeraron de acuerdo con el siguiente esquema: Portaobjeto 1 mAb1-1, 2 µg/ml) Portaobjeto 2 (mAb1-1, 0.5 µg/ml), Portaobjeto 3 (MslgG2a, 2 µg/ml), Portaobjeto 4 (MslgG2a, 0,5 µg/ml), Portaobjeto 5 (control del ensayo [omitir el anticuerpo primario]), portaobjetos 6 (anti-β₂-microglobulina [control de tinción de tejidos]).
Adrenal	HT 2342-2	1,3,4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	El tejido faltante en el portaobjetos 3 en la ejecución 1. Tinción repetida en la ejecución 4 e interpretación basada en la evaluación de los portaobjetos teñidos en la ejecución 4.
Adrenal	HT 2924-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Adrenal	HT 2478-1	1,3,4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	El tejido faltante en el portaobjetos 3 en la ejecución 1. Tinción repetida en la ejecución 4 e interpretación basada en la evaluación de los portaobjetos teñidos en la ejecución 4.
Vejiga (urinaria)	HT 1316-3	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Vejiga (urinaria)	HT 1328-4	1,3	NE	NE	NE	NE	NE	NE	Mucosa no presente en las secciones. Tejido registrado como no evaluado (NE, por sus siglas en inglés). Reemplazado con el HT 3128-1 en la ejecución 4.
Vejiga (urinaria)	HT 3128-1	4,5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Reemplazo para el HT 1328-4. Escasa mucosa presente. Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Vejiga (urinaria)	HT 1244-13	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Células sanguíneas	HT 3257	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Peroxidasa endógena residual (granulocitos).
Células sanguíneas	HT 3014	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Peroxidasa endógena residual (granulocitos). Escasa celularidad en el portaobjetos 4.
Células sanguíneas	HT 3015	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Peroxidasa endógena residual (granulocitos).

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Vasos sanguíneos (endotelio)	Todos los tejidos		Detallado bajo los tejidos individuales						
Tabla 1									
Médula ósea	HT 2173-2	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos poco ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Médula ósea	HT 2194-2	1,3,4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay tinción en el portaobjetos 1 en la ejecución 1. Tinción repetida en la ejecución 4 e interpretación basada en la evaluación de los portaobjetos teñidos en la ejecución 4.
Médula ósea	HT 2207-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos poco ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Cerebelo	HT 3065-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos raros en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Cerebelo	HT 2277-6	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos raros en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Cerebelo	HT 2117-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Corteza cerebral	HT 614-12	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción ocasional a frecuente de núcleos en el portaobjeto 1 y núcleos raros en el portaobjeto 2. La tinción nuclear a veces incluía la membrana nuclear.
Corteza cerebral	HT 3143-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos raros en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Corteza cerebral	HT 2297-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos raros en el portaobjetos 1; juzgada de especificidad indeterminada.
Cérvix	HT 2970-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Ostium externo.
Cérvix	HT 2974-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Ostium interno y glándulas endocervicales. Tinción no específica de la mucosa en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación.
Cérvix	HT 2910-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Ostium interno y glándulas endocervicales.
Esófago	HT 2110-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica de la mucosa en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación. Tinción de núcleos raros en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Esófago	HT 2277-7	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Esófago	HT 2580-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Ojo	HT 3048-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Retina, coroides, esclerótica. Pigmento de melanina endógena.
Ojo	HT 2383-4	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Retina, coroides, esclerótica. Pigmento de melanina endógena.
Ojo	HT 3041-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Retina, coroides, esclera, córnea, conjuntiva. Pigmento de melanina endógena.
Trompa de Falopio (oviducto)	HT 2974-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos ocasionales a frecuentes en la mucosa y núcleos raros en células de estroma en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Trompa de Falopio (oviducto)	HT 2573-1	1,3	M	M	M	M	M	M	No hay trompa de Falopio presente en las secciones. Tejido registrado como faltante (M). Reemplazado con HT 2970-1 en la ejecución 4.
Trompa de Falopio (oviducto)	HT 2970-1	4,5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Reemplazo para HT 2573-1. Tinción de núcleos ocasionales a frecuentes en la mucosa y núcleos raros en células de estroma en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Trompa de Falopio (oviducto)	HT 1953-1	1,3	M	M	M	M	M	M	No hay trompa de Falopio presente en las secciones. Tejido registrado como faltante (M). Reemplazado con HT 2941-1 en la ejecución 4.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Trompa de Falopio (oviducto)	HT 2941-1	4,5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Reemplazo para HT 1953-1. Tinción de núcleos ocasionales a frecuentes en la mucosa y núcleos raros en células de estroma en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Corazón	HT 2791-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos raros en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Corazón	HT 1270-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Corazón	HT 2789-2	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos raros en el portaobjetos 1; juzgada de especificidad indeterminada.
Riñón (glomérulo, túbulo)	HT 2276- 12	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica de contenidos de lumen tubular en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación.
Riñón (glomérulo, túbulo)	HT 1188-6	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Riñón (glomérulo, túbulo)	HT 2114-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos raros en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Intestino grueso (colon)	HT 2169-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica de la mucosa en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación. Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros).

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Intestino grueso (colon)	HT 2051-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica de la mucosa en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación. Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros).
Intestino grueso (colon)	HT 2149-1	1,3	NE	NE	NE	NE	NE	NE	Mucosa no representada adecuadamente en secciones. Tejido registrado como no evaluado (NE, por sus siglas en inglés). Reemplazado con HT 2170-1 en la ejecución 4.
Intestino grueso (colon)	HT 2170-1	4,5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Reemplazo para HT 2149-1. Tinción no específica de la mucosa en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación. Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros).
Hígado	HT 1243-9	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento biliar/bilirrubina endógeno.
Hígado	HT 3057-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento biliar/bilirrubina endógeno. Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros). Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Hígado	HT 3065-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento biliar/bilirrubina endógeno. Tinción de núcleos raros en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Ganglio linfático	HT 2182-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros).
Ganglio linfático	HT 2165-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Muestra pequeña; juzgada adecuada. Pigmento de carbono exógeno.
Ganglio linfático	HT 2252-1	1,3	M	M	M	M	M	M	No hay ningún ganglio linfático presente en las secciones. Tejido registrado como faltante (M). Reemplazado con el HT 2406-1 en la ejecución 4.
Ganglio linfático	HT 2406-1	4,5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Reemplazo para HT 2252-1. Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros). Pigmento de carbono exógeno. Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Pulmón	HT 3056-1	1,3						Pos.	Pigmento de carbono exógeno.
Células epiteliales, bronquiolar (citoplasma, gránulos citoplasmáticos)			1-2+ (raro)	1+ (muy raro)	Neg.	Neg.	Neg.		
Otros elementos			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
Pulmón	HT 3131-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento de carbono exógeno. Tinción de núcleos ocasionales en portaobjetos 1; juzgada de especificidad indeterminada.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Pulmón	HT 3130-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento de carbono exógeno. Tinción de núcleos ocasionales a frecuentes en el portaobjeto 1; juzgada de especificidad indeterminada.
Glándula mamaria (mama)	HT 2345-2	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica menor del material extracelular en lúmenes de glandular ductales en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación.
Glándula mamaria (mama)	HT 654-6	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica menor del material extracelular en lúmenes de glandular ductales en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación.
Glándula mamaria (mama)	HT 2349-4	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica menor del material extracelular en lúmenes de glandular ductales en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación.
Músculo estriado (esquelético)	HT 1909-11	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Músculo estriado (esquelético)	HT1974-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Músculo estriado (esquelético)	HT 1975-2	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Las secciones también contenían nervio periférico.
Nervio, periférico	HT 3159-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Nervio, periférico	HT 3147-1	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Nervio, periférico	HT 1179-2	1,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Muestra pequeña; juzgada adecuada.
Ovario	HT 2431-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Muestra pequeña; juzgada adecuada.
Ovario	HT 2435-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Ovario	HT 2443-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Páncreas	HT 2248-2	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos ocasionales a frecuentes en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada
Páncreas	HT 2049-2	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Páncreas	HT 2039-2	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica del citoplasma de las células epiteliales acinares ocasionales en los portaobjetos; obstaculizada pero no excluye la interpretación. Tinción de núcleos ocasionales en portaobjetos 1; juzgada de especificidad indeterminada.
Placenta	HT 2919-1	2,3						Pos.	No hay comentarios del tejido.
Trofoblastos (membrana, citoplasma)			1-3+ (ocas.)	1-3+ (raro)	Neg.	Neg.	Neg.		

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Otros elementos			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
Placenta	HT 2392-1	2,3						Pos.	No hay comentarios del tejido.
Trofoblastos (membrana, citoplasma)			1-3+ (frec.)	1-3+ (ocas. a frec.)	Neg.	Neg.	Neg.		
Otros elementos			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
Placenta	HT 1702-1	2,3						Pos.	No hay comentarios del tejido.
Trofoblastos (membrana, citoplasma)			1-3+ (ocas.)	1-3+ (raramente ocas.)	Neg.	Neg.	Neg.		
Otros elementos			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
Próstata	HT 562-7	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Próstata	HT 1730-3	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Próstata	HT 1926-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Pituitaria	HT 3112-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Adenohipófisis. Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Pituitaria	HT 3114-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Adenohipófisis y neurohipófisis. Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Pituitaria	HT 3199-1	2,3						Pos.	Adenohipófisis y neurohipófisis.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Células epiteliales, adenohipófisis (citoplasma)			1-3+ (raramente ocas.)	1-3+ (raramente ocas.)	Neg.	Neg.	Neg.		
Otros elementos			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
Paratiroidea	HT 3012-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Paratiroidea	HT 3153-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Paratiroidea	HT 3152-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Glándula salival	HT 3061-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento exógeno de tinta para marcar tejidos.
Glándula salival	HT 3057-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Glándula salival	HT 1226-6	2,3	M	M	M	M	M	M	No presenta glándula salival presente en las secciones. Tejido registrado como faltante (M). Reemplazado con HT 2297-1 en la ejecución 4.
Glándula salival	HT 2297-1	4,5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Reemplazo para HT 1226-6. Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Piel	HT 2842-3	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Piel	HT 2930-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento de melanina endógena.
Piel	HT 2936-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento de melanina endógena.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Intestino delgado	HT 2965-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica de la mucosa en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación. Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros).
Intestino delgado	HT 2662-1	2,3	NE	NE	NE	NE	NE	NE	Mucosa no presente en las secciones. Tejido registrado como no evaluado (NE, por sus siglas en inglés). Reemplazado con HT 2859-1 en la ejecución 4.
Intestino delgado	HT 2859-1	4,5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Reemplazo para HT 2662-1. Tinción no específica de la mucosa en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación. Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros). Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Intestino delgado	HT 2697-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica de la mucosa en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación. Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros). Tinción de núcleos ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Bazo	HT 1910-11	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros). Tinción de núcleos ocasionales a frecuentes en el portaobjeto 1 y núcleos ocasionales del portaobjeto 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Bazo	HT 2342-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros).
Bazo	HT 2336-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros). Tinción de núcleos poco ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Médula espinal	HT 1047-3	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento de melanina endógena. Tinción de núcleos poco ocasionales en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada. La tinción nuclear a veces incluía la membrana nuclear.
Médula espinal	HT 2118-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos ocasionales a frecuentes en el portaobjeto 1 y de núcleos raros a ocasionales en el portaobjeto 2; juzgada de especificidad indeterminada. La tinción nuclear a veces incluía la membrana nuclear.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Médula espinal	HT 2884-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos ocasionales a frecuentes en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada. La tinción nuclear a veces incluía la membrana nuclear.
Estómago	HT 2939-1	2,3						Pos.	La muestra solo consistió en mucosa. Tinción no específica de la mucosa en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación.
Células epiteliales, mucosa (membrana basal, citoplasma basal)			1-2+ (raramente ocas.)	1-2+ (raro)	Neg.	Neg.	Neg.		
Otros elementos			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
Estómago	HT 3162-1	2,3,4						Pos.	No hay tinción en el portaobjeto 1 en la ejecución 2. Tinción repetida en la ejecución 4 e interpretación basada en la evaluación de los portaobjetos teñidos en la ejecución 4.
Células epiteliales, mucosa (membrana basal, citoplasma basal)			1-2+ (raramente ocas.)	1-2+ (raro)	Neg.	Neg.	Neg.		
Otros elementos			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
Estómago	HT 3018-1	2,3						Pos.	Tinción no específica de la mucosa en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Células epiteliales, mucosa (membrana basal, citoplasma basal)			1-2+ (raramente ocas.)	1-2+ (raramente ocas.)	Neg.	Neg.	Neg.		
Otros elementos			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
Testículos	HT 1316-3	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Testículos	HT 2276-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Testículos	HT 3064-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Tiroides	HT 682-4A	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Tiroides	HT 483	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos raros en el portaobjetos 1; juzgada de especificidad indeterminada.
Tiroides	HT 478	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos frecuentes en los portaobjetos 1 y 2; juzgada de especificidad indeterminada.
Timo	HT 1405-3	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica menor de corpúsculos de Hassall en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación. Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros).
Timo	HT 1495- 12	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.

Tejido	Fuente	Ejecutar	Artículo de prueba (mAb1-1)		Artículo control (MslgG2a)		Control de ensayo	Control de validación de tejidos (tinción de tejidos)	Comentarios/hallazgos no específicos de tejidos
			2 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml	0,5 µg/ml			
Timo	HT 1404-3	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción no específica menor de corpúsculos de Hassall en múltiples portaobjetos; No excluye la interpretación. Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros).
Amígdala	HT 2962-2	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros).
Amígdala	HT 3122-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Peroxidasa endógena residual (leucocitos residentes raros).
Amígdala	HT 3171-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento hemo endógeno.
Uréter	HT 2765-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Uréter	HT 2726-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.
Uréter	HT 1763-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pigmento hemo endógeno. Tinción de núcleos raros en el portaobjetos 1; juzgada de especificidad indeterminada.
Tabla 2									
Útero (endometrio)	HT 3075-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos raros en el portaobjetos 1; juzgada de especificidad indeterminada.
Útero (endometrio)	HT 2910-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Tinción de núcleos raros en el portaobjetos 1; juzgada de especificidad indeterminada.
Útero (endometrio)	HT 3074-1	2,3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	No hay comentarios del tejido.

±= equívoco, 1 = débil, 2+ = moderado, 3+ = fuerte, 4+ = intenso, neg. = negativo, pos. = positivo, M = faltante, NE = no evaluado, NS = no manchado, ocas. = ocasional, frec. = frecuente. Se incluyeron modificadores de frecuencia para proporcionar el porcentaje aproximado de tinción de los números esperados de ese tipo de célula o elemento de tejido en esa ubicación. La frecuencia de células con tinción se identificó de la siguiente manera: muy rara (< 1 % de células de un tipo de célula particular); raro (1-5 % de células de un tipo de célula particular); raro a ocasional (> 5-25 % de las células de un tipo de célula particular); ocasional (> 25-50 % de células de un tipo particular); ocasional a frecuente (> 50-75 % de células de un tipo de célula particular); frecuente (> 75-100 % de células de un tipo de célula particular). -----

En general, en las siguientes reivindicaciones, los términos usados no deben interpretarse como una limitación de las reivindicaciones a las modalidades específicas descritas en la especificación y las reivindicaciones, sino que debería interpretarse como una inclusión de todas las modalidades posibles junto con el alcance completo de los equivalentes a los que dichas reivindicaciones tienen derecho. En consecuencia, las reivindicaciones no están limitadas por la descripción.