COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA DEGRADACIÓN SELECTIVA DE PROTEÍNAS DISEÑADAS POR INGENIERÍA

1. REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 63/230,225, presentada el 6 de agosto de 2021, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad para cualquier propósito.

2. CAMPO

[0002] La presente descripción se refiere a polipéptidos diseñados por ingeniería que comprenden dominios de degradación, compuestos, composiciones y métodos para su preparación y uso en la degradación de proteínas diseñadas por ingeniería en células.

3. ANTECEDENTES

[0003] Se han desarrollado para uso terapéutico células diseñadas por ingeniería que comprenden un polipéptido heterólogo diseñado por ingeniería, tales como células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR-T). La modulación de los niveles de expresión de tales polipéptidos heterólogos diseñados por ingeniería puede mejorar el beneficio terapéutico de las células diseñadas por ingeniería, por ejemplo, disminuyendo los efectos secundarios y/o aumentando la eficacia de las células diseñadas por ingeniería.

[0004] Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona en la presente polipéptidos diseñados por ingeniería y agentes de degradación, en donde los polipéptidos diseñados por ingeniería comprenden un dominio de degradación que media la ubiquitinación en la célula cuando el dominio de degradación se une a un agente de degradación.

4. RESUMEN

[0005] En el presente documento, en ciertas modalidades, se describen compuestos y composiciones de los mismos para modular los niveles de un polipéptido heterólogo en una célula. En diversas modalidades, los compuestos y composiciones de los mismos pueden usarse para disminuir el nivel del polipéptido heterólogo en la célula.

[0006] Las presentes modalidades pueden entenderse más completamente con referencia a la descripción detallada y los ejemplos, que pretenden ejemplificar las modalidades no limitantes.

5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0007] La Fig. 1A muestra una alineación de secuencias de proteínas de la familia IKZF humana IKZF1-IKZF5 (SEQ ID NO: 48-52). La FIG. 1B muestra una tabla de motivos G putativos que contienen secuencias de tipo dedos de zinc de IKZF1-IKZF5 humana. Las secuencias de motivos G están subrayadas.

[0008] La FIG. 2 es un diagrama de un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un degron IKZF1 ZNF2 C-terminal.

[0009] La FIG. 3 es un esquema de un sistema modelo basado en células Jurkat reporteras para estudiar la actividad y degradación del CAR.

[00010] Las FIG. 4A-4C muestran que los receptores CAR marcados con IKZF1 ZNF2 retienen la función (FIG. 4A), pero solo se degradan parcialmente con altas concentraciones del Compuesto A (FIG. 4C). La estructura del Compuesto A se muestra en la FIG. 4B.

[00011] La FIG. 5A muestra un esquema de receptores CAR que comprenden degrones IKZF1 ZNF1 C-terminal, IKZF1 ZNF2 C-terminal y/o IKZF1 ZNF3 C-terminal. Cada uno de los receptores CAR también comprende un scFv de unión a CD19 N-terminal. La FIG. 5B muestra que los receptores CAR con degrones IKZF1 C-terminal retienen actividad. La FIG. 5C muestra la degradación de los receptores CAR con degrones IKZF1 C-terminal en presencia de concentraciones crecientes del Compuesto A. La FIG. 5D muestra que la degradación es específica al degron IKZF1 de tipo silvestre.

[00012] Las FIG. 6A-6C muestran la reducción de los niveles de receptores CAR y la inhibición de la actividad de receptores CAR después de la degradación en un sistema reportero Jurkat.

[00013] La FIG. 7 muestra que la señalización endógena de Erk es atenuada por la degradación de CAR.

[00014] La FIG. 8 muestra la alineación del motivo G que contiene C2H2 tipo dedos de zinc G de ciertos miembros de la familia IKZF humana (SEQ ID NO: 21, 32, 27, 38, 40, 29, 47, 31, 23, 20, 26 y 37).

[00015] La FIG. 9 muestra los degrones C2H2 tipo dedos de zinc previstos a partir de varias proteínas humanas (SEQ ID NO: 72-109).

[00016] La FIG. 10A muestra la estructura del Compuesto B. La FIG. 10B muestra la ubiquitinación de los motivos G modificados de ZNF2 Ikaros usando un ensayo de ubiquitinación *in vitro*.

[00017] La FIG. 11A muestra la estructura del Compuesto C. Las FIG. 11B-11C muestran que la degradación de los receptores CAR marcados con degron IKZF1 ZNF2_3 Q1F depende de CRBN y de la vía de ubiquitina proteasoma (UPP).

[00018] Las FIG. 12A-12B muestran que la degradación del receptor CAR marcado con IKZF1 ZNF2_3 Q1F reduce los niveles de receptores CAR y la señalización en un ensayo reportero Jurkat.

[00019] La FIG. 13A muestra la estructura de un receptor CAR marcado con IKZF1 ZNF2_3 Q1F. La FIG. 13B muestra que la expresión del receptor CAR marcado con IKZF1 ZNF2_3 Q1F se puede titular con el Compuesto C en células T primarias.

[00020] Las FIG. 14A-14D muestran que la función del receptor CAR marcado con IKZF1 ZNF2_3 Q1F se puede titular con el Compuesto C en células T primarias.

[00021] La FIG. 15 es un esquema del ensayo de estimulación crónica antigénica usado para probar la persistencia funcional.

[00022] La FIG. 16A muestra la estructura del Compuesto D. Las FIG. 16B-16C muestran que las células CAR T en reposo transitorio están menos activadas por la exposición crónica de antígenos y mantienen un fenotipo de estilo inexperto.

[00023] Las FIG. 17A-17B muestra que las células CAR T en reposo transitorio producen más citoquinas proinflamatorias y demuestran una mejor actividad antitumoral después de la exposición crónica de antígenos que las células sin reposo.

[00024] Las FIG. 18A-18C muestran que el receptor CAR marcado con degron Q1F puede disminuirse de forma reversible *in vivo*.

[00025] Las FIG. 19A-19D muestran que la disminución del receptor CAR marcado con degron Q1F reduce la expansión del tumor sensible *in vivo*.

[00026] Las FIG. 20A-20D muestran que la introducción de una etiqueta degron en marco de los locus AURKA o TOX endógenos permite el control de los niveles de proteína por medio del compuesto.

6. DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00027] Como se usa en este documento, los términos "que comprende" y "que incluye" se pueden usar intercambiablemente. Los términos "que comprende" y "que incluye" deben interpretarse como que especifican la presencia de las características o componentes indicados a los que se hace referencia, pero no excluyen la presencia o la adición de una o más características, componentes o grupos de los mismos. Además, los términos "que comprende" y "que incluye" pretenden incluir ejemplos contemplados por el término "que consiste en". En

consecuencia, el término "que consiste en" se puede utilizar en lugar de los términos "que comprende" y "que incluye" para proporcionar más modalidades específicas de la invención.

[00028] El término "que consiste en" significa que una modalidad tiene al menos el 90%, 95%, 97%, 98% o 99% de las características o componentes declarados que lo componen. En otra modalidad, el término "que consiste en" excluye del alcance de cualquier enumeración posterior, cualquier otra característica o componente, excepto aquellos que no son esenciales para el efecto técnico que se desea lograr.

[00029] Como se usa en este documento, el término "o" debe interpretarse como un "o" inclusivo que significa cualquiera o cualquier combinación. Por lo tanto, "A, B o C" significa cualquiera de los siguientes: "A; B; C; A y B; A y C; B y C; A, B y C." Una excepción a esta definición ocurrirá solo cuando una combinación de elementos, funciones, pasos o actos son de alguna manera inherentemente excluyentes entre sí.

[00030] En la presente descripción, se debe entender que cualquier rango de concentración, rango de porcentaje, rango de relación o rango de números enteros incluye el valor de cualquier número entero dentro del rango indicado y, cuando corresponda, fracciones del mismo (como una décima y una centésima de un entero), a menos que se indique lo contrario. Además, se debe entender que cualquier rango de números mencionado en este documento en relación con cualquier característica física, tal como subunidades de polímero, tamaño o grosor, incluye cualquier número entero dentro del rango mencionado, a menos que se indique lo contrario. Como se usa en el presente documento, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" significan ±20%, ±10%, ±5% o ±1% del rango, valor o estructura indicados, a menos que se indique lo contrario.

[00031] Como se usa en el presente documento, un "polipéptido diseñado" es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que no existe en la naturaleza. Aunque porciones de un polipéptido diseñado por ingeniería se puedan encontrar en la naturaleza, el polipéptido diseñado por ingeniería no se encuentra en su totalidad. En algunas modalidades, un polipéptido diseñado por ingeniería comprende una secuencia de aminoácidos de origen natural que ha sido modificada, por ejemplo, fusionándola o insertándola en un dominio de degradación. En algunas de tales modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería resultante retiene sustancialmente la actividad del polipéptido original de origen natural. En algunas modalidades, un polipéptido diseñado por ingeniería comprende dos o más, o tres o más, o cuatro o más dominios derivados de dos o más, o tres o más, o cuatro o más polipéptidos de origen natural. En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería comprende un dominio de degradación.

[00032] Como se usa en la presente, "degron" y "dominio de degradación" se usan indistintamente y significan una secuencia de aminoácidos que, cuando está presente en un polipéptido en una célula, da como resultado la ubiquitinación del polipéptido mediante una ubiquitina ligasa en presencia de un compuesto que se une tanto al dominio de degradación como a la ubiquitina ligasa. En algunas modalidades, el compuesto se une al dominio de degradación y con cereblon. En algunas modalidades, un polipéptido diseñado por ingeniería comprende un dominio de degradación. Tras la ubiquitinación mediante la ubiquitina ligasa, el polipéptido que comprende el dominio de degradación puede degradarse.

Polipéptidos diseñados por ingeniería de ejemplo

[00033] En el presente documento se proporcionan polipéptidos diseñados por ingeniería que comprenden un dominio de degradación. En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería es un receptor CAR. En algunas modalidades, dichos polipéptidos comprenden un dominio transmembrana, un dominio extracelular y un dominio intracelular. En algunas de tales modalidades, el dominio de degradación está ubicado en el dominio intracelular del polipéptido diseñado por ingeniería. En algunas modalidades, el dominio extracelular comprende un ligando, un dominio de unión a ligando o un dominio de unión a antígeno. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno cancerígeno. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo, o un scFv. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende un dominio de unión a antígeno de anticuerpo de dominio único. En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende al menos un dominio coestimulador. En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende al menos un dominio de señalización, tal como un dominio de señalización de ITAM. En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería es un receptor CAR que comprende un dominio de degradación, como se describe más adelante.

[00034] En algunas modalidades, un polipéptido diseñado por ingeniería se basa en una proteína de origen natural en la que se ha insertado un dominio de degradación mediante ingeniería genética o en la que se ha fusionado un dominio de degradación. El polipéptido diseñado resultante puede comprender una secuencia de aminoácidos adicional de origen natural o no natural. En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería se basa en una proteína nuclear o citoplasmática de origen natural. En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería retiene sustancialmente la actividad de la proteína de origen natural. La degradación del polipéptido diseñado por ingeniería puede lograrse poniendo en contacto una célula que exprese el polipéptido diseñado por ingeniería, tal como mediante la administración

de un agente de degradación. En algunas de tales modalidades, el dominio de degradación se deriva de una secuencia de aminoácidos tipo dedos de zinc (ZNF) de la familia Ikaros, y el agente de degradación es una molécula pequeña que se une a una ubiquitina ligasa, tal como una ligasa E3. La administración del agente de degradación a células que expresan el polipéptido diseñado por ingeniería que comprende el dominio de degradación da como resultado la ubiquitinación del polipéptido diseñado por ingeniería que comprende el dominio de degradación por la ligasa E3 y la degradación del polipéptido diseñado por ingeniería. En algunas modalidades, el agente de degradación es un compuesto que se une a cereblon y al dominio de degradación.

[00035] En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería comprende una proteína de origen natural y un dominio de degradación fusionado o insertado dentro de la proteína de origen natural. Cuando el dominio de degradación se "fusiona con" la proteína, el polipéptido diseñado por ingeniería puede comprender un enlazador que conecta el dominio de degradación con la proteína, tal como un enlazador de aminoácidos. Tales enlazadores de aminoácidos pueden tener cualquier longitud y, por ejemplo, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10 o 1-5 aminoácidos. En algunas modalidades, los enlazadores de aminoácidos están compuestos por glicina y serina.

[00036] Las proteínas de ejemplo no limitantes a las que se puede fusionar un dominio de degradación o en las que se puede insertar un dominio de degradación incluyen PRDM1, TGFBR2, CASP8, CBLB, CD5, CISH, CGKA, DGKz, MAP4K1, ARID2, BACH2, CHX37, KLF2, KLF3, KLF6, MAF, SIGLEC9, TOX, ZBTB32, PTPN2, AKT1, PIK3CD, MT1E, MT2A, CSK, ITK, PAG1, PDCD4, ZC3H12A, DNMT1, DNMT3A, PRBM1, STK4, TET2, BNIP3, FAS, CBL, BGAT5, RNF128, STK17B, TRIB1, TXNIP, UBASH3A, BATF, FLI1, IKZF1, IKZF2, IRF4, NFATC1, NR4A1, MAP2K1, MAP2K2, MAP4K4, PPARGC1A, RELB, TMEM173, USP10, MT1A, miembros de la familia PP2A, RASA2, NR4A2, NR4A3, AHR, CD70, LHALS1, SOCS1, SOCS2, SOCS3, TAZ, USP21 o YAP1. En algunas modalidades, la proteína es una proteína de mamífero, tal como una proteína humana.

[00037] En algunas modalidades, un dominio de degradación se fusiona o se inserta en una proteína endógena en una célula. En algunas de tales modalidades, se puede insertar una secuencia que codifica el dominio de degradación en el genoma de una célula que expresa la proteína endógena de manera que el polipéptido diseñado por ingeniería es expresado, comprendiendo el dominio de degradación fusionado o insertado en la proteína endógena. Varios métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos, tal como una secuencia que codifica un dominio de degradación, dentro del genoma de una célula son conocidos en el arte, incluyendo, por ejemplo, recombinación mediada por virus adenoasociado (AAV) o no viral

dirigida por homología vía CRISPR/Cas, transducción lentiviral, o transposición. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de degradación se fusiona o se inserta en una proteína endógena en una célula inmunitaria, tal como un linfocito T. En algunas de tales modalidades, las células T se aíslan, se diseñan por ingeniería para expresar el polipéptido diseñado y se administran a un paciente. Después de la administración al paciente, se puede administrar posteriormente un agente de degradación cuando se desea la degradación del polipéptido diseñado por ingeniería.

[00038] En algunas modalidades, se introduce en una célula una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido diseñado por ingeniería. Los métodos para introducir ácidos nucleicos en células son conocidos en la técnica e incluyen vectores sintéticos, vectores lentivirales o retrovirales, plásmidos de replicación autónoma, un virus (p. ej., un retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus del herpes) o similares, que contienen ácido (polinucleótidos) que codifica los polipéptidos diseñados por ingeniería descritos en el presente documento.

Dominios de degradación de ejemplo

[00039] Los polipéptidos diseñados por ingeniería proporcionados en el presente documento comprenden un dominio de degradación. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que se une a un agente de degradación. El agente de degradación se asocia con el dominio de degradación y con una ligasa de ubiquitina, lo que da como resultado la ubiquitinación del polipéptido diseñado por ingeniería.

[00040] En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos derivada de un motivo G de una proteína de la familia Ikaros, como Ikaros, Helios, Aiolos, Eos o Pegasus. Los motivos G de ejemplo no limitantes están subrayados en las secuencias que se muestran en la FIG. 1B. Un dominio de degradación proporcionado en el presente documento, en algunas modalidades, comprende una secuencia de aminoácidos que se modifica a partir de una secuencia nativa de motivo G reemplazando el aminoácido en la primera posición con una fenilalanina (F). En algunas modalidades, el dominio de degradación se deriva de un motivo G que naturalmente comprende Q en la primera posición, por lo que el dominio de degradación comprende una sustitución Q1F.

[00041] En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos $FCX_1X_2CGX_3X_4$ (SEC ID NO: 1). En algunas modalidades, X_1 se selecciona de asparagina, aspartato, glicina, glutamina, metionina, histidina, triptófano, isoleucina, arginina, leucina, valina, treonina y fenilalanina; X_2 se selecciona de glutamina, arginina, histidina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina, valina y metionina; X_3 se selecciona de alanina, serina, cisteína, arginina, leucina, isoleucina, metionina y glicina; y X_4 se selecciona de

serina, metionina, lisina, isoleucina, valina, histidina, glutamina, arginina, fenilalanina y triptófano. En algunas modalidades, X_1 se selecciona de asparagina, glutamina, metionina, histidina, triptófano, isoleucina, arginina, leucina, valina, treonina y fenilalanina. En algunas modalidades, X_2 se selecciona de glutamina, arginina, histidina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina y metionina. En algunas modalidades, X_3 se selecciona de alanina, serina, cisteína y glicina. En algunas modalidades, X_4 se selecciona de serina, metionina, histidina, glutamina, arginina, fenilalanina y triptófano. En algunas modalidades, X_1 es asparagina. En algunas modalidades, X_2 es glutamina. En algunas modalidades, X_3 es alanina o serina. En algunas modalidades, X_3 es alanina. En algunas modalidades, X_4 es serina. En algunas modalidades, el dominio de degradación del polipéptido diseñado por ingeniería comprende la secuencia de aminoácidos FCNQCGAS (SEC ID NO: 3).

[00042] En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos $FCX_1X_2CGX_3X_4X_5$ (SEC ID NO: 2), en donde X_1, X_2, X_3 y X_4 son como se definen anteriormente. En algunas modalidades, X_5 se selecciona de fenilalanina, triptófano, metionina, arginina, histidina, leucina, tirosina, cisteína y glutamina. En algunas modalidades, X_5 se selecciona de fenilalanina, triptófano, metionina, arginina, histidina, leucina, tirosina y glutamina. En algunas modalidades, X_5 se selecciona de fenilalanina, triptófano, metionina, leucina, tirosina y glutamina. En algunas modalidades, X_5 es fenilalanina.

[00043] En varias modalidades, el dominio de degradación comprende al menos un dominio tipo dedos de zinc que comprende el motivo G modificado discutido anteriormente. En algunas modalidades, al menos un dominio tipo dedos de zinc se deriva de una proteína de la familia Ikaros, tales como Ikaros, Helios, Aiolos, Eos o Pegasus. Los motivos G que comprenden dedos de zinc no limitantes de ejemplo se muestran en la FIG. 1B. En varias modalidades, el dominio de degradación comprende uno, dos, tres o cuatro dominios tipo dedos de zinc. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende un dominio tipo dedos de zinc que comprende un motivo G y al menos un dominio tipo dedos de zinc que no comprende un motivo G. Los dominios tipo dedos de zinc pueden derivar o no de la misma proteína. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende dos dominios tipo dedos de zinc.

[00044] En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los dedos de zinc 2 (ZNF2) de Ikaros humano. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% idéntica a los dedos de zinc 2 (ZNF2) de Ikaros humano, y al menos a un dominio tipo dedos de zinc adicional, tal como al menos un dominio tipo dedos de zinc adicional de una proteína de la

familia Ikaros. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los dedos de zinc 2 (ZNF2) de Ikaros humano y a ZNF1 o a ZNF3 de Ikaros humano. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los dedos de zinc 2 (ZNF2) y a los dedos de zinc 3 (ZNF3) de Ikaros humano.

[00045] En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 145 a 167 de Ikaros humano (FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLH; SEC ID NO: 21). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 140 a 162 de Helios humano (FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLH; SEC ID NO: 27). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 146 a 168 de Aiolos humano (FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLH; SEC ID NO: 32). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 187 a 209 de Eos humano (FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLH; SEC ID NO: 38).

[00046] En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 141 a 168 de Ikaros humano (GERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS; SEC ID NO: 15). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 136 a 163 de Helios humano (GERPFHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS; SEC ID NO: 60). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 142 a 169 de Aiolos humano (GERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHT; SEC ID NO: 61). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 183 a 210 de Eos humano (GERPFHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS; SEC ID NO: 62).

[00047] En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 141 a 196 de Ikaros humano (GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS; SEC ID NO: 6). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al

menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 136 a 191 de Helios humano (GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCSY ACRRRDALTG HLRTHS; SEC ID NO: 63). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 142 a 197 de Aiolos humano (GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACQRRDALTG HLRTHS; SEC ID NO: 64). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 183 a 238 de Eos humano (GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS; SEC ID NO: 65).

[00048] En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos: GERPFFCX$_1$X$_2$CGX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 5), en donde X$_1$, X$_2$, X$_3$ y X$_4$ y X$_5$ son como se definen anteriormente. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos: GERPFFCX$_1$X$_2$CGX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCSYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 66), en donde X$_1$, X$_2$, X$_3$ y X$_4$ y X$_5$ son como se definen anteriormente. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos: GERPFFCX$_1$X$_2$CGX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNLLRHIKLHTGEKPFKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 67), en donde X$_1$, X$_2$, X$_3$ y X$_4$ y X$_5$ son como se definen anteriormente. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos: GERPFFCX$_1$X$_2$CGX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 68), en donde X$_1$, X$_2$, X$_3$ y X$_4$ y X$_5$ son como se definen anteriormente.

[00049] En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos: GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 7). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos: GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCSYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 69). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos: GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHTGEKPFKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 70). En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos:

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 71).

Constructos de receptores de antígenos quiméricos de ejemplo

[00050] La capacidad para modular la expresión de los receptores CAR degradándolos en presencia de un agente de degradación tiene muchas ventajas sobre la falta de capacidad para modular la expresión del receptor CAR. Por ejemplo, efectos que se dan sobre la diana pero fuera del tumor, los cuales son mediados por células inmunitarias que expresan receptores CAR, que potencialmente conducen a la toxicidad, pueden reducirse o eliminarse mediante la degradación del receptor CAR. Una respuesta inmunitaria mediada por CAR demasiado fuerte puede reducirse o eliminarse mediante la degradación de CAR. La disfunción de las células T causada por la activación crónica y la sobreexpresión de los puntos de control se puede evitar ciclando la expresión de CAR y/o titulando la expresión de CAR. Dicha degradación de CAR se logra aquí expresando un CAR que comprende un dominio de degradación proporcionado aquí y administrando un agente de degradación, según sea necesario. En algunas de tales modalidades, el agente de degradación es una molécula pequeña que se une a una ubiquitina ligasa, tal como una ligasa E3. La administración del agente de degradación a células que expresan el polipéptido CAR que comprende el dominio de degradación da como resultado la ubiquitinación del polipéptido CAR que comprende el dominio de degradación por la ligasa E3 y la degradación del polipéptido CAR. En algunas modalidades, el agente de degradación es un compuesto que se une a cereblon y al dominio de degradación.

[00051] En el presente documento se proporcionan polipéptidos diseñados por ingeniería que comprenden o consisten en receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden (a) componentes de un CAR, tales como un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, un dominio de señalización celular y/o un dominio coestimulador, y (b) un dominio de degradación. Cuando el CAR fusionado con el dominio de degradación se expresa en una célula inmunitaria (p. ej., en un linfocito T o una célula asesina natural) en presencia de un agente de degradación, tal como un compuesto de unión a cereblon, una ligasa E3, tal como cereblon, y el dominio de degradación en el CAR se unen al agente de degradación, lo que da como resultado la formación de un complejo de ligasa E3 que ubiquitina el dominio de degradación. Por lo tanto, la actividad de los CAR descritos en este documento (p. ej., la actividad *in vivo*) puede controlarse poniendo en contacto una célula que expresa el CAR que comprende el dominio de degradación (p. ej., linfocitos T diseñados por ingeniería para expresar tales polipéptidos CAR) con un agente de degradación, tal como un compuesto de unión a cereblon.

[00052] En algunas modalidades, en el presente documento se proporciona un polipéptido diseñado por ingeniería que es un receptor CAR que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, un dominio de señalización primaria e intracelular y un dominio de degradación. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en el presente documento.

[00053] En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería es un receptor CAR que comprende, en orden desde el extremo amino hasta el extremo carboxi, un dominio de unión a antígeno – un dominio transmembrana – un dominio de señalización de células T primarias y/o un dominio coestimulador – un dominio de degradación. En algunas modalidades, el dominio de degradación está ubicado en el extremo C del receptor CAR. En algunas modalidades, el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en el presente documento. En algunas modalidades, el receptor CAR comprende un dominio coestimulador.

[00054] En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería es un receptor CAR que comprende, en orden desde el extremo amino al extremo carboxi, (i) un dominio extracelular [ECD] – un dominio transmembrana [TM] – un dominio coestimulador [CoD] – un dominio de señalización [SigD] – un dominio de degradación [DD]. En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería es un receptor CAR que comprende, en orden desde el extremo amino hasta el extremo carboxi, ECD-TM-CoD-DD-SigD. En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería es un receptor CAR que comprende, en orden desde el extremo amino al extremo carboxi, ECD-TM-DD-CoD-SigD. Los dominios de degradación también pueden insertarse dentro de otro dominio, como dentro del dominio coestimulador o dentro del dominio de señalización, preferiblemente de manera que se retenga la actividad deseada de los dominios.

Dominios de unión a antígeno de ejemplo

[00055] Los dominios de unión a antígeno de los receptores CAR proporcionados en el presente documento pueden ser cualquier dominio, motivo o secuencia de polipéptido que se una a un antígeno.

[00056] En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento es una porción de unión a antígeno de un receptor. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento es un receptor para un ligando producido por una célula tumoral.

[00057] En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento es una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. En

algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento es un anticuerpo, una cadena de anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla o una porción de unión a antígeno del mismo, un dominio Fc, un dominio de anclaje de glicofosfatidilinositol o un fragmento de anticuerpo scFv.

[00058] En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento es un agente de unión a antígeno macromolecular basado en péptidos, p. ej., una proteína de presentación de fagos.

[00059] En ciertas modalidades, la unión al antígeno mediante un dominio de unión a antígeno de un receptor CAR descrito en el presente documento se restringe a la presentación del antígeno en asociación con los complejos principales de histocompatibilidad (MHC). En ciertas modalidades, la unión al antígeno mediante un dominio de unión a antígeno de un CAR descrito en el presente documento no está restringida por los MHC.

[00060] El antígeno unido/reconocido por el dominio de unión a antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento puede ser cualquier antígeno de interés. En algunas modalidades, el antígeno es un antígeno que se expresa en la superficie de una célula (p. ej., una célula tumoral, tal como una célula tumoral sólida o una célula tumoral de cáncer de sangre).

[00061] En algunas modalidades, el antígeno unido/reconocido por el dominio de unión a antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento es un antígeno en una célula tumoral, por ejemplo, el antígeno es un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). Ejemplos de antígenos de células tumorales que pueden ser reconocidos por los receptores CAR descritos en el presente documento (es decir, unidos por el dominio de unión al antígeno de los receptores CAR) incluyen, pero no se limitan a, 4-1BB, 5T4, 8H9, B7-H6, antígeno de adenocarcinoma, a-fetoproteína, antígeno de maduración de células B (BCMA), BAFFR, células de linfoma B, antígeno C242, CA9, antígeno carcinoembrionario, CA-125, anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), CCR4, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD23 (receptor de IgE), CD28, CD30 (T FRSF8), CD33, CD38, CD40, CD44v6, CD44v7/8, CD51, CD52, CD56, CD70 CD74, CD80, CD123, CD152, CD171, CD200, CD221, CE7, CEA, C-MET, CLAUDIN6, CLAUDIN18.3, CNT0888, CTLA-4, DRS, EpCAM, ErbB2, ErbB3/4, EGFR, EGFRγIII, EphA2, EGP2, EGP40, FAP, AchR fetal, dominio B extra de fibronectina, receptor de folato A, receptor de folato 1, G250/CAIX, GD2, GD3, glicoproteína 75, GP MB, HER2/neu, HGF, HLA-AI MAGE Al, HLA-A2 NY-ESO-1, HMW-MAA, quinasa del receptor del factor de dispersión humano, receptor de IGF-1, IGF-I, IgGl, IL-6, IL-13, receptor a2 de IL-13, receptor a de IL-11, receptor 1 del factor de crecimiento tipo insulina, integrina a5I31, integrina avI33, cadena ligera kappa, Ll-CAM, cadena ligera lambda, Lewis Y,

mesotelina, MORAb-009, MS4A1, MUCl, MUCl 6, mucina CanAg, NCAM, ácido N-glicolilneuramínico, ligandos NKG2D, NPC-IC, PDGF-R a, PDL192, fosfatidilserina, antígeno prostático específico del cáncer (PSCA), células de carcinoma prostático, PSMA, PSC1, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, spl7, TAG72, tenascina C, TGF β2, TGF-I3, TL1A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, antígeno tumoral CTAA16.88, UPK1B, VEGF-A, receptores de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, TEM1, TEM8 y/o vimentina.

[00062] En algunas modalidades, el antígeno unido/reconocido por el dominio de unión a antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento es un antígeno expresado en una célula tumoral de un linfoma/leucemia, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un carcinoma adrenocortical, un carcinoma de tiroides, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma, p. ej., un melanoma maligno, un carcinoma de piel, un carcinoma colorrectal, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un tumor endocrino, un sarcoma de Ewing, un tumor neuroectodérmico primitivo periférico, un tumor sólido de células germinales, un hepatoblastoma, un neuroblastoma, un sarcoma de tejido blando no rabdomiosarcoma, un osteosarcoma, un retinoblastoma, un rabdomiosarcoma, un tumor de Wilms, un glioblastoma, un mixoma, un fibroma, un lipoma o similares.

[00063] En algunas modalidades, el antígeno unido/reconocido por el dominio de unión a antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento es un antígeno expresado en una célula tumoral de leucemia linfocítica crónica (linfoma linfocítico pequeño), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocitario, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma extraganglionar de células B de la zona marginal, linfoma MALT, linfoma ganglionar de células B de la zona marginal, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primaria, linfoma de Burkitt, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular grande de linfocitos T, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, linfoma linfocítico T/NK extraganglionar, linfoma linfocítico T tipo nasal, tipo enteropatía, linfoma hepatoesplénico de linfocitos T, linfoma de células NK blásticas, micosis fungoides, síndrome de Sézary, linfoma cutáneo primario anaplásico de células grandes, papulosis linfomatoide, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma periférico de linfocitos T (no especificado), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin.

[00064] En algunas modalidades, el antígeno unido/reconocido por el dominio de unión al antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento es un antígeno no asociado a tumor o un antígeno no específico de tumor. En determinadas modalidades, el

antígeno está relacionado con un aspecto de un tumor, p. ej., el entorno del tumor. Por ejemplo, un tumor puede inducir un estado inflamatorio en el tejido que rodea al tumor y puede liberar factores de crecimiento angiogénicos, interleucinas y/o citocinas que promueven la angiogénesis en el tumor y en la periferia del tumor. Por lo tanto, en ciertas modalidades, el antígeno es un factor de crecimiento, una citocina o una interleucina (p. ej., un factor de crecimiento, citocina o interleucina asociada con la angiogénesis o la vasculogénesis). Tales factores de crecimiento, citocinas e interleucinas pueden incluir, sin limitarse a, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF) e interleucina 8 (IL-8).

[00065] En algunas modalidades, el antígeno unido/reconocido por el dominio de unión al antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento es una molécula de patrón molecular asociada al daño (DAMP; también conocida como alarmina) liberada por el tejido normal en respuesta al daño localizado causado por un tumor. Ejemplos de DAMP en los que se puede unir el dominio de unión a antígeno de los receptores CAR descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, proteína de choque térmico, proteína de alta movilidad del grupo 1 asociada a cromatina (HMGBl), S100A8 (MRP8, calgranulina A), S100A9 (MRP 14, calgranulina B), amiloide sérico A (SAA), ácido desoxirribonucleico, trifosfato de adenosina, ácido úrico y sulfato de heparina.

Dominios transmembrana de ejemplo

[00066] Tal como se usa en el presente documento, "dominio transmembrana" incluye dominios transmembrana de paso en los que el polipéptido que comprende el dominio transmembrana comprende ambos dominios intracelulares y extracelulares, y dominios de anclaje a la membrana en los que el polipéptido que comprende el dominio transmembrana comprende un dominio intracelular pero no un dominio extracelular.

[00067] Los dominios transmembrana de los polipéptidos diseñados por ingeniería descritos en el presente documento pueden comprender cualquier molécula conocida en la técnica que funcione como un dominio transmembrana, p. ej., conocida por un experto en la técnica para funcionar en el contexto para el que se utilizará, tal como en un receptor CAR. Los polipéptidos diseñados por ingeniería con dominios transmembrana descritos en el presente documento se pueden obtener o derivar del dominio transmembrana de cualquier proteína transmembrana, y pueden incluir todo o una parte de dicho dominio transmembrana.

[00068] En algunas modalidades, el dominio transmembrana de un polipéptido diseñado descrito en este documento, como un CAR, se obtiene o deriva de un receptor de células T, p.

ej., el dominio transmembrana del polipéptido diseñado descrito en este documento se obtiene o deriva de la cadena alfa de un receptor de células T, la cadena beta de un receptor de células T, la cadena zeta de un receptor de células T.

[00069] En algunas modalidades, el dominio transmembrana del polipéptido diseñado por ingeniería descrito en el presente documento se obtiene o deriva de CD28, CD3, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS, TIM3, LAB3, TIGIT, PD1 o CTLA4, un receptor de citoquinas, un receptor de interleucinas o un receptor de factor de crecimiento.

Dominios de señalización de ejemplo

[00070] El dominio de señalización celular primaria de los receptores CAR descritos en el presente documento puede comprender cualquier molécula conocida en la técnica que funcione como un dominio de señalización celular, p. ej., conocida por un experto en la técnica para funcionar en el contexto de receptores CAR. En algunas modalidades, el dominio de señalización celular de los receptores CAR descritos en el presente documento comprende un dominio de señalización de células T primarias.

[00071] En algunas modalidades, el dominio de señalización celular primaria de los receptores CAR descritos en el presente documento es o comprende ZAP-70, o una variante de transducción de señales del mismo.

[00072] En algunas modalidades, el dominio de señalización celular primaria de los receptores CAR descritos en el presente documento es o comprende un IT AM. En algunas modalidades, tal IT AM es el IT AM de CD3ε, CD3ζ, CD3η, FcRγ, FcRβ, CD3δ, CD3γ, CD5, CD22, CD20, CD79a, CD79b, CD278 (ICOS), FcERI, CD66d, DAP10 o DAP12.

Dominios coestimuladores de ejemplo

[00073] En ciertas modalidades, los receptores CAR descritos en el presente documento comprenden un dominio coestimulador. El(los) dominio(s) coestimulador(es) de los receptores CAR descritos en el presente documento pueden comprender cualquier molécula conocida en la técnica para funcionar como un dominio coestimulador, p. ej., conocida por un experto en la técnica para funcionar en el contexto de receptores CAR.

[00074] En algunas modalidades, el dominio coestimulador de un receptor CAR descrito en el presente documento se obtiene o deriva de una secuencia polipeptídica coestimuladora de CD27, una secuencia polipeptídica coestimuladora de CD28, una secuencia polipeptídica coestimuladora de OX40 (CD134), una secuencia polipeptídica coestimuladora de OX40

(CD134), una secuencia polipeptídica coestimuladora de 4-1BB (CD137), o una secuencia polipeptídica coestimuladora inducible de células T (ICOS).

[00075] En algunas modalidades, el dominio coestimulador de los receptores CAR descritos en el presente documento es o comprende 4-1BB (CD137), CD28, OX40, un receptor activador de células K, BTLA, un receptor de ligando Toll, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CDS, ICAM-L LFA-1 (CD1 la/CD18), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), RANK, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, Kp80 (KLRF1), Kp44, Kp30, Kp46, CD 19, CD4, CD8a, CD8p, IL2Rp, IL2Ry, IL7Ra, ITGA4, VLAl, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDl ld, ITGAE, CD103, ITGAL, CDl la, LFA-1, ITGAM, CDl lb, ITGAX, CDl lc, ITGB 1, CD29, ITGB2, IL15Ra, IL7R, CD18, CD132, LFA-1, ITGB7, KG2D, KG2C, T FR2, TRANCE/RA KL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD 160 (BY55), PSGL1, CD 100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD 150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, DAP10, DAP 12, un ligando de CD83, una molécula MHC de clase I, una proteína receptora de TNF, una proteína de tipo inmunoglobulina, un receptor de citoquinas, una integrina y/o una molécula de activación linfocítica de señalización.

Otros componentes de ejemplo

[00076] En ciertas modalidades, los polipéptidos diseñados por ingeniería, como los receptores CAR, descritos en el presente documento comprenden además un motivo de supervivencia de células T. El motivo de supervivencia de células T puede ser cualquier secuencia o motivo de aminoácidos que facilite la supervivencia de un linfocito T después de la estimulación por un antígeno. En ciertas modalidades, el motivo de supervivencia de las células T es, o se deriva de, CD3, CD28, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular de receptor de IL-15, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21 o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGFB).

Modificaciones de ejemplo

[00077] En ciertas modalidades, los polipéptidos diseñados por ingeniería proporcionados en el presente documento se modifican, p. ej., mediante acilación, amidación, glicosilación, metilación, fosforilación, sulfatación, sumoilación y/o ubiquitilación (u otras modificaciones de proteínas).

[00078] En ciertas modalidades, los polipéptidos diseñados por ingeniería proporcionados en el presente documento están marcados con un marcador capaz de proporcionar una señal detectable, p. ej., un radioisótopo o un compuesto fluorescente.

[00079] En determinadas modalidades, se derivatizan una o más cadenas laterales de las diseñadas por ingeniería proporcionadas en el presente documento, p. ej., derivatización de residuos terminales amino y lisinilo con anhídridos de ácido succínico u otro ácido carboxílico, o derivatización con, p. ej., imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4 pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato. En ciertas modalidades, los grupos laterales carboxilo, aspartilo o glutamilo, pueden modificarse selectivamente por reacción con carbodiimidas (R—N=C=N—) tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o l-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida.

Ácidos nucleicos de ejemplo

[00080] En el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos diseñados por ingeniería descritos en el presente documento. Los ácidos nucleicos útiles en la producción de los polipéptidos diseñados por ingeniería descritos en el presente documento incluyen ADN, ARN y análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácido nucleico se pueden modificar en la fracción de base, la fracción de azúcar o el esqueleto de fosfato, y pueden incluir una sustitución de desoxiuridina por desoxitimidina, una sustitución de 5-metil-2'-desoxicitidina o 5-bromo-2'-desoxicitidina por desoxicitidina. Las modificaciones de la fracción de azúcar pueden incluir la modificación del 2'hidroxilo del azúcar ribosa para formar los azúcares 2'-O-metil o 2'-O-alilo. El esqueleto de fosfato desoxirribosa se puede modificar para producir ácidos nucleicos de morfolino, en los que cada fracción de base está unida a un anillo de morfolino de seis miembros o ácidos nucleicos peptídicos, en los que el esqueleto de desoxifosfato se reemplaza por un esqueleto pseudopeptídico y se conservan las cuatro bases. Consulte, por ejemplo, Summerton y Weller (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7: 187-195; y Hyrup *et al.* (1996) Bioorgan. Med. Chain. 4:5-23. Además, el esqueleto de desoxifosfato se puede reemplazar, por ejemplo, con un esqueleto de fosforotioato o fosforoditioato, un esqueleto de fosforoamidita o un esqueleto de alquilfosfotriéster.

[00081] En determinadas modalidades, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos diseñados por ingeniería descritos en el presente documento están comprendidos dentro de un vector de ácido nucleico. Por ejemplo, las células de interés, p. ej., linfocitos T se pueden transformar usando vectores sintéticos, vectores lentivirales o retrovirales, plásmidos de replicación autónoma, un virus (p. ej., un retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus del herpes) o

similares, que contienen ácido (polinucleótidos) que codifica los polipéptidos diseñados por ingeniería descritos en el presente documento. En algunas modalidades, el vector que comprende los polipéptidos diseñados por ingeniería descritos en el presente documento es un vector retroviral. En algunas modalidades, el vector que comprende el ácido nucleico que codifica los polipéptidos diseñados por ingeniería descritos en el presente documento es un vector lentiviral. Los vectores lentivirales adecuados para la transformación de células, p. ej., linfocitos T, incluyen, pero no se limitan a, los vectores lentivirales descritos en las Patentes de EE. UU. No. 5,994,136; 6,165,782; 6,428,953; 7,083,981; y 7,250,299. Los vectores de VIH adecuados para la transformación de células, p. ej., linfocitos T, incluyen, pero no se limitan a, los vectores descritos en la Patente de EE .UU. No. 5,665,577.

[00082] En ciertas modalidades, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos diseñados por ingeniería descritos en el presente documento están unidos operativamente a un promotor. En algunas modalidades, dicho promotor es un promotor específico de células T, un promotor específico de células asesinas naturales (NK), un promotor inducible que funciona dentro de las células T o células NK, o un promotor constitutivo.

Células de ejemplo

[00083] Los polipéptidos diseñados por ingeniería proporcionados en el presente documento pueden expresarse en células para las que la expresión de polipéptidos diseñados por ingeniería, tales como receptores CAR, es útil, es decir, las células se diseñan por ingeniería para que comprendan un ácido nucleico que codifica un polipéptido diseñado por ingeniería proporcionado en el presente documento, de modo que, tras la expresión del ácido nucleico en la célula, la célula expresa el polipéptido diseñado por ingeniería descrito en este documento. Por ejemplo, los polipéptidos diseñados por ingeniería descritos en el presente documento pueden expresarse en linfocitos T o células asesinas naturales. Las células proporcionadas en este documento que expresan los CAR descritos en este documento pueden denominarse "células CAR".

[00084] En determinadas modalidades, en el presente documento se proporciona una célula (p. ej., un linfocito T o una célula asesina natural) que ha sido modificada para expresar un polipéptido diseñado por ingeniería que comprende un dominio de degradación proporcionado en el presente documento. En algunas modalidades, la célula se ha modificado para expresar un polipéptido diseñado que es un CAR que comprende (a) componentes de un CAR, como un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, un dominio de señalización celular y/o un dominio coestimulador, y (b) un dominio de degradación. En algunas modalidades, la célula se ha modificado para expresar un polipéptido diseñado que

comprende un dominio de degradación fusionado o insertado en otra proteína. Poner en contacto la célula modificada con un agente de degradación proporcionado en el presente documento da como resultado la ubiquitinación y degradación del polipéptido diseñado por ingeniería.

[00085] En algunas modalidades, los polipéptidos diseñados por ingeniería proporcionados en el presente documento se expresan en linfocitos T. Los linfocitos T pueden ser linfocitos T de estilo inexperto o linfocitos T restringidos por MHC. En ciertas modalidades, los linfocitos T son linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). En ciertas modalidades, los linfocitos T se han aislado de una biopsia de tumor o se han expandido de linfocitos T aislados de una biopsia de tumor. En ciertas otras modalidades, los linfocitos T se han aislado o se expanden a partir de linfocitos T expandidos a partir de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o linfa.

[00086] En algunas modalidades, las células (p. ej., linfocitos T) diseñadas por ingeniería para comprender/expresar el polipéptido diseñado por ingeniería descrito en el presente documento son autólogas de un individuo al que se administrarán las células (p. ej., linfocitos T) como parte de un método de tratamiento descrito en el presente documento. En otras modalidades, las células (p. ej., linfocitos T) diseñadas por ingeniería para comprender/expresar un polipéptido diseñado por ingeniería descrito en el presente documento son alogénicas de un individuo al que se van a administrar las células (p. ej., linfocitos T). Cuando se utilizan células alogénicas (p. ej., linfocitos T) para preparar las células modificadas, tales como células CAR, es preferible seleccionar células (p. ej., linfocitos T) que reduzcan la posibilidad de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) en el individuo. Por ejemplo, en ciertas modalidades, los linfocitos T específicos de virus se seleccionan para la preparación de linfocitos CAR T; se espera que tales linfocitos tengan una capacidad nativa muy reducida para unirse a, y por lo tanto ser activados por, cualquier antígeno receptor. En determinadas modalidades, el rechazo mediado por receptor de células alogénicas (p. ej., linfocitos T) puede reducirse mediante la coadministración al huésped de uno o más agentes inmunosupresores, p. ej., ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, ciclofosfamida o similares.

[00087] En algunas modalidades, los linfocitos T se obtienen de un individuo, se expanden opcionalmente y luego se transforman con un vector que codifica un polipéptido diseñado por ingeniería proporcionado en el presente documento y luego se expanden opcionalmente. En algunas modalidades, los linfocitos T se obtienen de un individuo, se expanden opcionalmente y luego se transforman con un vector que codifica un polipéptido diseñado por ingeniería que es un receptor CAR descrito en el presente documento y luego se expanden opcionalmente. Las células que contienen el vector pueden obtenerse, en algunas

modalidades, usando un marcador seleccionable. En algunas modalidades, los linfocitos T se obtienen de un individuo, se expanden opcionalmente y luego se modifican para insertar un dominio de degradación en un gen de proteína endógena deseada de modo que se expresa un polipéptido diseñado por ingeniería que comprende el dominio de degradación fusionado o insertado dentro de la proteína endógena. Los linfocitos T modificados pueden expandirse adicionalmente de manera opcional.

[00088] En ciertas modalidades, los linfocitos T utilizados para expresar los polipéptidos diseñados por ingeniería proporcionados en el presente documento comprenden proteínas TCR nativas, p. ej., TCR-α y TCR-β que son capaces de formar complejos TCR nativos. En ciertas otras modalidades, uno o ambos genes nativos que codifican TCR-α y TCR-β en los linfocitos T se modifican para que no sean funcionales, p, ej., se elimina una parte o todo o se inserta una mutación.

[00089] En ciertas modalidades, el dominio o dominios de señalización de un CAR descritos en el presente documento se pueden usar para promover la proliferación y expansión de células (p. ej., linfocitos T) que comprenden/expresan el receptor CAR. Por ejemplo, los linfocitos T no modificados y los linfocitos T que comprenden un polipéptido que comprende un dominio de señalización de CD3ζ y un dominio coestimulador de CD28 pueden expandirse usando anticuerpos contra CD3 y CD28, p. ej., anticuerpos unidos a perlas; consulte, p. ej., las patentes de EE. UU. No. 5,948,893; 6,534,055; 6,352,694; 6,692,964; 6,887,466; y 6,905,681. De manera similar, se pueden usar anticuerpos contra un motivo de señalización para estimular la proliferación de células (p. ej., linfocitos T) que comprenden un receptor CAR descrito en el presente documento.

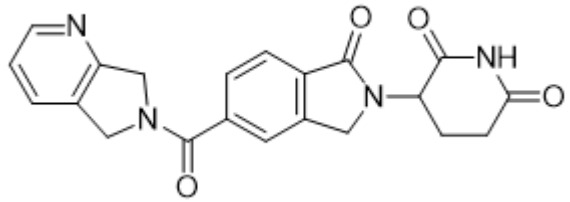
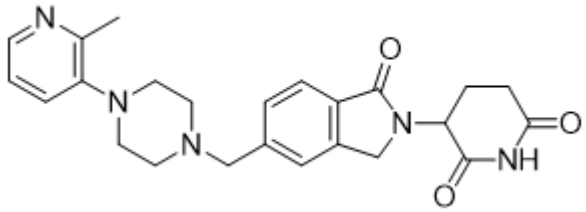
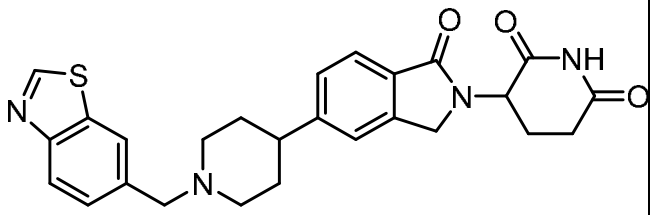
[00090] En ciertas modalidades, un polipéptido diseñado por ingeniería puede usarse como un "gen suicida" o "interruptor de seguridad" que permite eliminar sustancialmente todas las células que expresan el polipéptido diseñado por ingeniería cuando se desee. Por ejemplo, se puede insertar un dominio de degradación en un gen que expresa una proteína endógena necesaria para la supervivencia y/o para una actividad particular de una célula. Poner en contacto la célula con un agente de degradación da como resultado la ubiquitinación y degradación de la proteína endógena (es decir, del polipéptido diseñado por ingeniería que comprende el dominio de degradación y la proteína endógena), inhabilitando una actividad de la célula o eliminando la célula.

Agentes de degradación de ejemplo

[00091] Como se usa en el presente documento, el término "agente de degradación" se refiere a una molécula (p. ej., una molécula pequeña) capaz de unirse a un dominio de

degradación proporcionado en el presente documento y una ubiquitina ligasa, tal como una ligasa E3. En algunas modalidades, un agente de degradación se une a un dominio de degradación y se une a cereblon. En algunas modalidades, el agente de degradación se une al dominio de degradación y la ubiquitina ligasa, lo que da como resultado una asociación entre la ligasa E3 y el dominio de degradación. En algunas de tales modalidades, el polipéptido diseñado que comprende el dominio de degradación es ubiquitinado por la ubiquitina ligasa después de la asociación mediada por el agente de degradación.

[00092] En algunas modalidades, el agente de degradación es un compuesto de unión a cereblon. En algunas modalidades, el agente de degradación es 3-(5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4-b]piridin-6-carbonil)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona (Compuesto B), 3-(5-((4-(2-metilpiridin-3-il)piperazin-1-il)metil)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona (Compuesto C), o 3-[5-[1-(1,3-benzotiazol-6-ilmetil)-4-piperidil]-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona (Compuesto D).

Compuesto	Estructura	Nombre
B		3-(5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4-b]piridina-6-carbonil)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona
C		3-(5-((4-(2-metilpiridin-3-il)piperazin-1-il)metil)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona
D		3-[5-[1-(1,3-benzotiazol-6-ilmetil)-4-piperidil]-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona

[00093] En algunas modalidades, un agente de degradación es un compuesto descrito en el documento WO 2019/038717 A1, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[00094] Un agente de degradación usado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, o un enantiómero o una mezcla de sus enantiómeros; o una de sus sales, solvatos, hidratos, cocristales, clatratos o polimorfos farmacéuticamente aceptables puede administrarse como una dosis única tal como, p. ej., una única inyección en bolo, o tabletas

orales o píldoras; o a lo largo del tiempo, como, p. ej., infusión continua a lo largo del tiempo o dosis de bolo divididas a lo largo del tiempo.

[00095] Los agentes de degradación usados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento pueden formularse para administración intravenosa, intraarterial, parenteral, intramuscular, subcutánea, intratecal o intraocular, o administración dentro de un órgano o tejido particular.

Métodos de ejemplo

[00096] En algunas modalidades, se proporciona un método para reducir el nivel de un polipéptido diseñado por ingeniería que comprende un dominio de degradación, que comprende poner en contacto el polipéptido diseñado con un agente de degradación. En algunas modalidades, el contacto se produce en una célula y el agente de degradación se une al dominio de degradación y a una ubiquitina ligasa, lo que da como resultado la ubiquitinación y la degradación del polipéptido diseñado. En algunas modalidades, la degradación del polipéptido diseñado da como resultado una disminución de al menos una actividad de la célula y/o un aumento de al menos una actividad celular y/o muerte celular. Los efectos de ejemplo no limitantes incluyen reducir el umbral para la activación celular (tal como una célula T), aumentar la persistencia funcional de la célula (tal como una célula T), promover la supervivencia de la célula y aumentar la proliferación celular. En algunas modalidades, el agente de degradación es el Compuesto B, el Compuesto C o el Compuesto D. En algunas modalidades, el método comprende administrar el agente de degradación a un sujeto, en donde el sujeto comprende células que comprenden el polipéptido diseñado por ingeniería.

[00097] En algunas modalidades, el polipéptido diseñado por ingeniería se degrada en presencia del agente de degradación. En algunas modalidades, el agente de degradación interactúa con el dominio de degradación y con una ubiquitina ligasa, tal como cereblon. En algunas modalidades, el agente de degradación media un complejo que comprende el dominio de degradación, el agente de degradación y la ubiquitina ligasa, lo que da como resultado la ubiquitinación del polipéptido diseñado por ingeniería.

[00098] Las células modificadas proporcionadas en el presente documento, tales como linfocitos T (es decir, células T) modificadas para comprender/expresar un polipéptido diseñado por ingeniería (p. ej., células CAR), se pueden usar para tratar a un individuo que se beneficiaría de las células modificadas, por ejemplo, porque el individuo tiene un cáncer que expresa una diana de un receptor CAR. En algunas modalidades, la célula es una célula T efectora. En algunas modalidades, la célula es una célula T CD4+ o una célula T CD8+. En algunas

modalidades, la célula T, la célula T efectora, la célula T CD4+ o una célula T CD8+ comprende el polipéptido diseñado por ingeniería.

[00099] En algunas modalidades, en el presente documento se proporcionan métodos para eliminar células diana que expresan un antígeno unido por el dominio de unión a antígeno de un receptor CAR descrito en el presente documento, en donde tales métodos comprenden poner en contacto tales células diana con una célula modificada proporcionada en el presente documento (p. ej., una célula T o célula NK) que comprende/expresa un receptor CAR descrito en el presente documento. En algunas modalidades, tal célula diana es una célula cancerígena, p. ej., una célula de cáncer de sangre o una célula tumoral sólida. En algunas modalidades, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar el cáncer, tales métodos comprenden administrar una población de células modificadas descritas en el presente documento, p. ej., células T o células NK, que comprenden/expresan un receptor CAR descrito en el presente documento, en donde tal CAR comprende un dominio de unión a antígeno específico para un antígeno cancerígeno (p. ej., TSA o TAA) a un sujeto.

[000100] En algunas modalidades, la célula diana o la célula cancerígena expresa uno o más de los siguientes antígenos, o un fragmento de los mismos: 4- IBB, 5T4, 8H9, B7-H6, antígeno de adenocarcinoma, a-fetoproteína, antígeno de maduración de células B (BCMA), BAFF, células de linfoma B, antígeno C242, CA9, antígeno carcinoembrionario, CA-125, anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), CCR4, CD3, CD4, CD 19, CD20, CD22, CD23 (receptor de IgE), CD28, CD30 (T FRSF8), CD33, CD38, CD40, CD44v6, CD44v7/8, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD123, CD152, CD171, CD200, CD221, CE7, CEA, C-MET, CNT0888, CTLA-4, DRS, EpCAM, ErbB2, ErbB3/4, EGFR, EGFRvIII, EphA2, EGP2, EGP40, FAP, AchR fetal, dominio B extra de fibronectina, receptor de folato a, receptor de folato 1, G250/CAIX, GD2, GD3, glicoproteína 75, GP MB, HER2/neu, HGF, HLA-AI MAGE Al, HLA-A2 NY-ESO-1, HMW-MAA, quinasa del receptor del factor de dispersión humano, receptor IGF-1, IGF-I, IgGl, IL-6, IL-13, receptor a2 de IL-13, receptor a de IL-11, receptor I del factor de crecimiento de tipo insulina, integrina a5I31, integrina avI33, cadena ligera kappa, Ll-CAM, cadena ligera lambda, Lewis Y, mesotelina, MORAb-009, MS4A1, MUCl, MUCl 6, mucina CanAg, NCAM, ácido N-glicolilneuramínico, ligandos NKG2D, NPC-IC, PDGF-R a, PDL192, fosfatidilserina, antígeno prostático específico del cáncer (PSCA), células de carcinoma prostático, PSMA, PSC1, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, spl7, TAG72, tenascina C, TGF β2, TGF-I3, TL1A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, antígeno tumoral CTAA16.88, VEGF-A, receptores de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, TEM1, TEM8 y/o vimentina.

[000101] En algunas modalidades, después de la administración de las células modificadas proporcionadas en el presente documento, tales como células de CAR, puede ser deseable

reducir o eliminar la expresión de CAR y, por lo tanto, reducir o eliminar la muerte celular dirigida. En algunas de tales modalidades, el método puede comprender además administrar al sujeto un agente de degradación proporcionado en el presente documento. La administración del agente de degradación da como resultado la degradación del polipéptido diseñado por ingeniería (p. ej., el receptor CAR) y reduce o elimina el direccionamiento de las células modificadas a las células que expresan el antígeno unido por el dominio de unión a antígeno del CAR. De esta forma, se puede modular la actividad de los tratamientos con células de CAR y se puede mejorar la seguridad.

[000102] En algunas modalidades, dicha población de células modificadas se administra primero al sujeto, seguido de la administración del agente de degradación en un período de tiempo específico después de la administración de la población de células modificadas, p. ej., 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 1 semana después de la administración de la población celular.

[000103] En algunas modalidades, el agente de degradación es el Compuesto B, el Compuesto C o el Compuesto D.

[000104] Una lista no limitante de cánceres que pueden tratarse de acuerdo con los métodos de tratamiento descritos en este documento incluye linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, carcinoma adrenocortical, carcinoma de tiroides, carcinoma nasofaríngeo, melanoma, carcinoma de piel, carcinoma colorrectal, tumor desmoide, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, tumor endocrino, sarcoma de Ewing, tumor neuroectodérmico primitivo periférico, tumor de células germinales sólidas, hepatoblastoma, neuroblastoma, sarcoma de tejido blando no rabdomiosarcoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, tumor de Wilms, glioma, glioblastoma, mixoma, fibroma y lipoma. Los linfomas y leucemias de ejemplo incluyen, sin limitarse a, leucemia linfocítica crónica (linfoma linfocítico pequeño), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocitario, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma extraganglionar de células B de la zona marginal, linfoma MALT, linfoma ganglionar de células B de la zona marginal, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primaria, linfoma de Burkitt, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular grande de linfocitos T, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, linfoma linfocítico T/NK extraganglionar, linfoma linfocítico T tipo nasal, tipo enteropatía, linfoma hepatoesplénico de linfocitos T, linfoma de células NK blásticas, micosis fungoides, síndrome de Sézary, linfoma cutáneo primario anaplásico de células grandes, papulosis

linfomatoide, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma periférico de linfocitos T (no especificado), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin.

[000105] La eficacia de las células modificadas descritas en el presente documento, tales como las células CAR, en el tratamiento de una enfermedad o trastorno, p. ej., en el tratamiento de un individuo que tiene cáncer, puede evaluarse mediante uno o más criterios específicos de la enfermedad o trastorno en particular, conocidos por los expertos en la técnica, para ser indicativo del progreso de la enfermedad o trastorno. En general, la administración de células CAR (p. ej., linfocitos CAR T) a un individuo que padece una enfermedad/trastorno (p. ej., cáncer) es eficaz cuando uno o más de dichos criterios se mueve de manera detectable, p. ej., significativamente desde un valor o rango de estado de enfermedad a, o hacía, un valor o rango normal.

[000106] Las células modificadas descritas en el presente documento se pueden formular en cualquier solución farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una solución adecuada para la entrega de células vivas, p. ej., solución salina (tal como la solución de Ringer), gelatinas, carbohidratos (p. ej., lactosa, amilosa, almidón o similares), ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. Tales preparaciones se esterilizan preferentemente antes de agregar las células CAR y pueden mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, amortiguador y colorantes. Los portadores farmacéuticos adecuados para su uso en la formulación de células CAR son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/05309.

[000107] En determinadas modalidades, las células modificadas (p. ej., las células CAR) descritas en el presente documento se formulan en dosis individuales, en donde tales dosis individuales comprenden al menos, como máximo o aproximadamente 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, o 1×10^{11} células.

[000108] En ciertas modalidades, las células modificadas (p. ej., las células CAR) descritas en el presente documento se formulan para administración intravenosa, intraarterial, parenteral, intramuscular, subcutánea, intratecal o intraocular, o administración dentro de un órgano o tejido particular.

7. EJEMPLOS

7.1. Ejemplo 1: Los receptores CAR con etiqueta de motivo G IKZF1 ZNF2 conservan la función.

[000109] La función de células CD19 CAR T marcadas con IKZF1 ZNF2 (FIG. 2, secuencia de aminoácidos de ZNF2 de la SEC ID NO: 15) se evaluó en un ensayo reportero, en el que se diseñaron por ingeniería células Jurkat para expresar tdTomato cuando el gen Nur77, asociado con la activación de CAR y TCR, se transcribe activamente (FIG. 3). Los vectores lentivirales que codifican el receptor CD19 CAR marcado con ZNF, receptor CD19 CAR no marcado o un control negativo de BCMA CAR no marcado se transdujeron en la línea celular Jurkat reportera. A continuación, las células transducidas se cocultivaron con una línea celular diana K562 que expresa CD19 a 37 ºC. Los niveles de tdTomato, tanto en forma de intensidad de fluorescencia media (MFI) como del porcentaje general de células positivas, se evaluaron mediante citometría de flujo cada 2 horas durante 12 horas. Los resultados mostraron que tanto el tiempo como los niveles de activación de CAR eran idénticos entre los CD19 CAR marcados y no marcados, mientras que los CAR T de BCMA no se activaron en presencia de la línea celular diana CD19 (FIG. 4A).

[000110] Para evaluar el nivel de degradación del receptor CAR logrado a diferentes concentraciones del Compuesto A, se realizó una titulación del fármaco del Compuesto A (FIG. 4B) en Jurkats transducidas con CAR CD19 marcado o no marcados con IKZF1 ZNF2. El Compuesto A se muestra en la Publicación de EE. UU. No. 2019/0008852 A1 en la página 42, Tabla 4 (Compuesto A). Las células se incubaron con el Compuesto A durante 24 horas a 37 °C, después de lo cual se evaluaron los niveles de receptor CAR mediante citometría de flujo. Los datos muestran que el degron del motivo G de IKZF1 ZNF2 medió ~55 % de degradación de CAR a altas concentraciones del Compuesto A (FIG. 4C). Este nivel de degradación de CAR puede no ser suficiente para inhibir la actividad del receptor CAR cuando se enfrenta a K562 que expresa un antígeno reconocido por CAR (datos no mostrados). Este resultado provocó una búsqueda para modificar la secuencia degron de la proteína para permitirle responder de forma más potente al Compuesto A.

7.2. Ejemplo 2: Evaluación de configuraciones alternativas de dedos de zinc IKZF1

[000111] El degron IKZF1-ZNF2 se modificó aún más para promover una degradación mejorada del receptor CAR. Se analizaron receptores CAR no marcados y receptores CAR marcados con los degrones originales IKZF1-ZNF2 junto con orientaciones alternativas y combinaciones de IKZF1 ZNF1, ZNF2 y ZNF3 (FIG. 5A). Cada receptor CAR incluía un dominio transmembrana CD28, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización

CD3ζ (CD3z). Los degrones IKZF1 se fusionaron con C-terminal. *Consulte* las SEC ID NO: 53-57. Un vector lentiviral que codifica CD19 CAR no marcado o CAR marcado con varias configuraciones de IKZF1-ZNF se transdujo en la línea celular Jurkat. Las células transducidas primero se cocultivaron con una línea celular diana K562 que expresa CD19 a 37 °C durante 7,5 horas, y los niveles normalizados de reportero tdTomato se evaluaron mediante citometría de flujo. Los resultados demostraron que ninguna de las etiquetas de degron disminuyó la actividad del CAR en presencia de antígeno en relación con el CAR no marcado (FIG. 5B). Luego, se cultivaron células Jurkat transducidas con CAR a 37 °C durante 24 horas en presencia de una titulación del Compuesto A para determinar los valores Y-máx y CE50 para cada degron. A partir de este experimento, se determinó que la marcación con ZNF2_3 condujo a una mayor degradación en las concentraciones más bajas del Compuesto A (FIG. 5C). El etiquetado de ZNF1_2 se excluyó debido a que ZNF1 contiene un motivo G y agrega complejidad adicional al degron en tándem. Por lo tanto, se seleccionó esta configuración para realizar más pruebas.

[000112] Para demostrar que esta degradación dependía de un degron funcional, el CAR etiquetado con WT ZNF2_3 (SEC ID NO: 13) se evaluó como se indicó anteriormente con una titulación del Compuesto A junto con receptores CAR marcados con ZNF2_3 que contenían una mutación G6N en el motivo G (QCNQCNASF; SEC ID NO: 17) (FIG. 5D). Mientras que el degron WT condujo a una degradación profunda de CAR a concentraciones más altas de Compuesto A, el mutante G6N etiquetado con CAR no respondió al Compuesto A en ninguna dosis. Estos resultados sugieren que el residuo G6 del motivo G contribuye a la interacción del Compuesto A con el degron ZNF2_3 optimizado.

7.3. Ejemplo 3: La degradación de receptores CAR marcados con IKZF1 ZNF2_3 inhibe la actividad.

[000113] La capacidad de anular la señalización de CAR T mediante la degradación de células CD19 CAR T marcadas con IKZF1 ZNF2_3 se evaluó en un ensayo Jurkat reportero. Se transdujo un vector lentiviral que codificaba CD19 CAR marcado o no marcado con ZNF2_3 (*consulte* el Ejemplo 2) en la línea celular reportera. Luego, las células transducidas se pretrataron durante 48 horas con Compuesto A 100 nM, luego se cocultivaron con una línea celular diana K562 que expresa CD19 a 37 ºC durante 8 horas. Los niveles de tdTomato en forma de intensidad de fluorescencia media (MFI) (FIG. 6B) y el porcentaje general de las células positivas, así como los niveles de receptores CAR normalizados (FIG. 6C), fueron evaluados mediante citometría de flujo (FIG. 6A). A esta concentración de Compuesto A, la degradación de los receptores CAR que contenían el degron ZNF2_3 fue lo suficientemente

profunda como para inhibir fuertemente la actividad de los receptores CAR cuando se desafiaron con células K562 que expresaban el antígeno afín.

[000114] La eliminación de la señalización con degradación de CAR fue determinada mediante la medición de la activación de la vía de señalización de MAPK aguas abajo. Las células Jurkat se transdujeron con CAR no marcado, CAR marcado con degron WT o CAR marcado con degron G6N como se describe anteriormente. Las células se pretrataron con Compuesto A 1 mM durante 12 horas a 37 ºC, luego se cocultivaron con bien sea células K562 parentales o que expresan CD19 durante 30 minutos. A continuación, las células se sedimentaron, lisaron, corrieron en un gel de proteína desnaturalizante, se transfirieron a una membrana, se probaron con anticuerpo y se visualizaron con una película (FIG. 7). Estos resultados muestran que las vías de señalización endógenas activadas por CAR, representadas aquí por la fosforilación de Erk (pErk), se atenúan en presencia de antígeno después de administrar el Compuesto A las células que contienen receptores CAR marcados con WT IKZF1 ZNF2_3.

7.4. Ejemplo 4: Mutagénesis de degron para identificar nuevos pares degron-compuesto

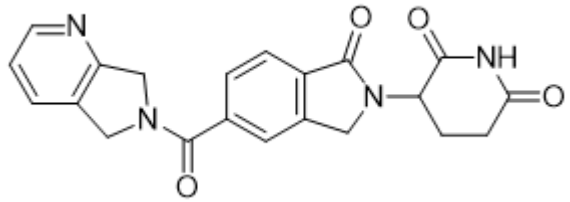
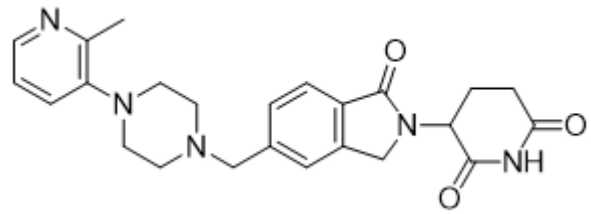
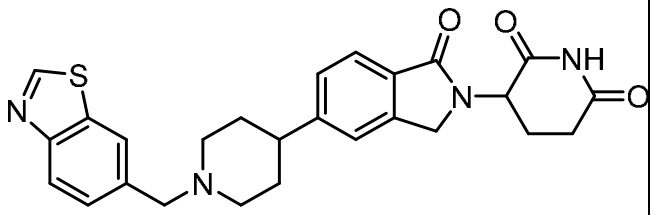
[000115] Los estudios estructurales revelan que la posición 1 del motivo G está muy cerca del compuesto cuando los sustratos se unen a los complejos cereblon/compuesto (no mostrado). La alineación de las secuencias de degron con motivo G de la familia IKZF (FIG. 8) y los degrones predichos dentro de otros dedos de zinc C2H2 (FIG. 9) revelan un conjunto diverso de aminoácidos en esta posición. Por lo tanto, para identificar pares adicionales de compuesto: degron, se realizaron mutaciones en la posición Q1 de IKZF1 ZNF2, y se seleccionaron compuestos potenciales para la actividad contra estos mutantes. Se construyeron plásmidos que contenían MBP-ZNF2 de Ikaros (aa 141-196) con aminoácidos alternativos en la posición Q1, y se llevó a cabo una selección de ubiquitinación *in vitro* usando varios compuestos, incluido el Compuesto B (FIG. 10A). Después del tratamiento, las células se sedimentaron, lisaron, corrieron en un gel de proteína desnaturalizante, se transfirieron a una membrana, se probaron con anticuerpo y se visualizaron con una película (FIG. 10B). Como se muestra en la FIG. 10B, IKZF1 ZNF2 Q1F estaba fuertemente ubiquitinado en presencia del Compuesto B.

7.5. Ejemplo 5: Cribado de moléculas pequeñas para identificar compuestos con actividad potente contra degron Q1F

[000116] Un conjunto de compuestos con potencial para actuar sobre degrones fue evaluado contra degron Q1F, resultando en un conjunto de potentes parejas degron/molécula pequeña. Los vectores lentivirales que contenían CD19 CAR marcados con IKZF1 ZNF2_ZNF3

Q1F Nluc se transdujeron en células Jurkat. El receptor CD19 CAR era similar a CD19 CAR del Ejemplo 2, pero que comprendía el degron ZNF2_ZNF3 Q1F (SEC ID NO: 19). Las células transducidas se trataron con una titulación de cada molécula pequeña o sin fármaco y luego se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Las células se lavaron y tiñeron con reactivo de tinción apropiado para medir los niveles de receptor CAR. Las células se incubaron a 4 °C en los reactivos de tinción durante 20 minutos y luego se lavaron 3 veces antes de ser leídas en el citómetro de flujo. Los niveles de receptores CAR se normalizaron a células que no habían sido tratadas con el fármaco. Los valores CE50 e Y-min se calcularon utilizando la curva de titulación resultante. Esto identificó moléculas pequeñas que degradaron potentemente los receptores CAR marcados con degron Q1F (Tabla 1).

Tabla 1: Compuestos específicos de Q1F

Compuesto	Estructura	CE50 (degron Q1F)	Ymin (degron Q1F)
B		0,0048 uM	1,7 %
C		0,023 uM	12 %
D		0,0007 uM	4,2 %

7.6. Ejemplo 6: Los receptores CAR marcados con IKZF1 ZNF2_3 Q1F se degradan en un CRBN y en las vías ubiquitina-proteasoma de manera dependiente en presencia del Compuesto C

[000117] Se evaluó la dependencia de la degradación de receptores CAR marcados con degron Q1F en CRBN y la vía proteolítica de ubiquitina. El receptor CAR dirigido a CD19 se etiquetó con IKZF1 ZNF2_3 Q1F (SEC ID NO: 19) o Q1F/G6N (SEC ID NO: 59). Los

vectores lentivirales que contenían estos receptores CAR etiquetados se transdujeron luego en células Jurkat de tipo silvestre (WT) o cereblon (CRBN) knockout (KO).

[000118] Para determinar si el receptor CAR marcado con Q1F puede degradarse con el Compuesto C de una manera dependiente de CRBN, se trataron células Jurkat WT o Jurkat CRBN KO transducidas durante 1 hora con DMSO o 1 mM de Compuesto C (FIG. 11A) a 37 °C, después de lo cual se evaluaron los niveles de CAR mediante citometría de flujo. A esta concentración de Compuesto C, el receptor CAR marcado se degradó por debajo del 20 % permaneciendo en las células Jurkat WT, mientras que los niveles de receptor CAR marcado permanecieron idénticos a los de receptor CAR no marcado en las células Jurkat CRBN KO (FIG. 11B). A continuación, se probó la dependencia de la degradación de receptor CAR en la vía de ubiquitina-proteosoma mediante el tratamiento de Jurkats WT transducidas con receptor CAR marcado durante 2 horas con DMSO, 20 nM o 200 nM de Compuesto C solo, o junto con 2 µM del inhibidor de la enzima NEDD8 E1 MLN4924 o 2 µM de bloqueador de proteasoma Bortezomib (FIG. 11C). El fracaso para degradar el receptor CAR marcado con el Compuesto C en presencia de cualquiera de los inhibidores demuestra que una vía ubiquitina- proteasoma funcional (UPP) es esencial para la degradación de receptor CAR marcado con Q1F.

7.7. Ejemplo 7: La degradación de receptor CAR marcado con IKZF1 ZNF2_3 Q1F inhibe la actividad.

[000119] Se evaluó la capacidad de anular la señalización de CAR T mediante la degradación de células CD19 CAR T marcadas con IKZF1 ZNF2_3 Q1F en un ensayo Jurkat reportero (FIGS. 2 y 3). Un vector lentiviral que codifica CAR CD19 marcado con ZNF2_3 Q1F o Q1F/G6N se transdujo en la línea celular reportera. A continuación, las células transducidas se pretrataron durante 12 horas con 1 mM de Compuesto C o Compuesto B, luego se cocultivaron con una línea celular diana K562 precursora o que expresa CD19 a 37 ºC durante 8 horas. Los niveles de tdTomato en forma de porcentaje global de células positivas (FIG. 12A), así como la intensidad de fluorescencia media (MFI, FIG. 12B) se evaluaron mediante citometría de flujo. La degradación de los receptores CAR que contenían degron ZNF2_3 Q1F disminuyó la señalización en aproximadamente un 30 % utilizando 1 mM de Compuesto C y en aproximadamente 75 % utilizando el Compuesto B; esta diferencia relativa se correlaciona con la profundidad de degradación observada para cada uno. Además, la reducción de la actividad depende de tener un motivo G intacto, ya que la mutación G6N evita la inhibición.

7.8. Ejemplo 8: La degradación de receptor CAR marcado con IKZF1 ZNF2_3 Q1F inhibe la actividad en células T primarias.

[000120] La habilidad de usar compuestos para titular la función efectora primaria de CAR T al degradar el receptor anti-ROR1 CAR marcado con IKZF1 ZNF2_3 Q1F (FIG. 13A) se evaluó. El receptor CAR incluía dominios transmembrana, coestimuladores y de señalización similares a los de CD19 CAR, pero con un scFv anti-ROR1. Se transdujo un vector lentiviral que codifica anti-ROR1 CAR marcado o no marcado con ZNF2_3 Q1F en células T primarias activadas. Las células transducidas se expandieron durante 10 días en medios suplementados con IL2, IL7 e IL15 y luego se congelaron. Antes del experimento, las células se descongelaron y se dejaron reposar en medios con una titulación de dosis del Compuesto C o sin fármaco. Los niveles de receptor CAR se midieron por citometría de flujo (FIG. 13B), lo que demuestra que los niveles superficiales de CAR marcado con ZNF2_3 Q1F se pueden titular con un rango de concentraciones de Compuesto C. Para determinar los impactos de la degradación de CAR en la actividad de CAR T, las células se cocultivaron con una línea celular diana que expresa ROR1 de H-1975 marcada con rojo Nuclight a una relación de 1:4 de células efectoras: células diana. Los cocultivos se colocaron en Incucyte durante 24 horas para controlar la eliminación del tumor a través de la señal roja de Nuclight (FIG. 14A), y se recogieron sobrenadantes para medir la producción de citoquinas proinflamatorias por MSD (FIG. 14B-14D; IL-2, TNFα e IFNγ). Estos experimentos demostraron que la función efectora de las células CAR T primarias, medida tanto por la eliminación como por la producción de citoquinas, podría titularse dirigiendo CAR marcado con ZNF2_3 Q1F para la degradación con diferentes concentraciones del Compuesto C.

7.9. Ejemplo 9: La degradación de receptores CAR a través de degron Q1F conserva la función de CAR durante la exposición crónica al antígeno *in vitro*

[000121] Se evaluó *in vitro* el impacto funcional de proporcionar un descanso transitorio a las células T primarias durante la exposición crónica al antígeno a través de la degradación de CD19 CAR marcado con ZNF2_3 Q1F. La estimulación se proporcionó mediante placas recubiertas con un anticuerpo dirigido contra scFv CAR, y se evaluaron los diversos tiempos del reposo (FIG. 15). Las células se trataron con 3,9 nM de Compuesto D (FIG. 16A), luego se lavaron y dejaron en reposo en medio para permitir el restablecimiento completo de CAR previo a la reexposición. Las células en reposo se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar los niveles de CD27 y CD28 como un indicador de la población de estilo inexperto (FIG. 16B y 16C). Luego, las células CAR T se expusieron con una línea de células tumorales marcadas con rojo Nuclight en un formato esferoide (3D), y los sobrenadantes fueron recolectados para medir

la producción de citoquinas proinflamatorias utilizando un ensayo ELISA de Meso Scale Discovery. Estos experimentos muestran que proporcionar a las células CAR T un período de reposo transitorio conduce a una menor activación y mantiene una población de estilo más inexperto en comparación con las células CAR T que se someten a una exposición continua al antígeno. Este período de reposo transitorio también proporciona un beneficio funcional en términos de la producción de citocinas proinflamatorias como IL-2, TNFα e IFNγ (FIG. 17A) y función antitumoral (FIG. 17B); la pérdida progresiva de estas citocinas y de la citotoxicidad es una característica del agotamiento de las células T.

7.10. Ejemplo 10: La degradación de receptor CAR a través de degron Q1F conserva la función de CAR durante la exposición crónica al antígeno *in vitro*

[000122] Se evaluó *in vivo* la capacidad de degradar el receptor CAR marcado con ZNF2_3 Q1F. Se transdujo un vector lentiviral que codifica CD19 CAR marcado con ZNF2_3 Q1F en células T primarias activadas. Las células transducidas se expandieron durante 10 días en medios suplementados con IL2, IL7 e IL15 y luego se congelaron.

[000123] Para determinar la capacidad de degradación *in vivo* del receptor CAR marcado con degron en ausencia del tumor, las células CAR T se descongelaron, se dejaron en reposo durante 24 horas y se transfirieron adoptivamente a ratones inmunodeficientes NSG™ hembra sin tumor a una dosis de $2x10^6$ células por animal. Después de 24 horas, los ratones recibieron por vía oral vehículo, 0,85 u 8,5 mg/kg de Compuesto D (FIG. 18B). Se extrajo sangre 8, 24, 48 y 72 horas después (FIG. 18A), y se evaluó por flujo la proporción de células T CAR+, determinada por la tinción con anticuerpos anti-scFv y anti-CD3. En ambas dosis, menos del 5% de las células CD3+ CAR+ permanecieron a las 8 horas, e incluso a las 24 horas el receptor CAR permaneció significativamente degradado (FIG. 18C), lo que demuestra que el receptor CAR marcado con degron Q1F se puede degradar eficientemente *in vivo*. A las 48 horas de la dosificación, la expresión de CAR se restauró sustancialmente (FIG. 18C).

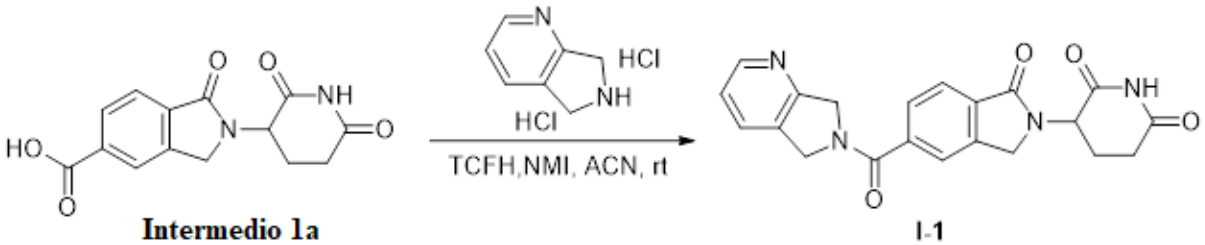
[000124] Para examinar la disminución de CAR marcado con degron *in vivo* en un modelo de cáncer de xenoinjerto y el impacto en la función de CAR T, se inyectaron ratones hembra NSG™ con $5x10^5$ de células tumorales Raji que expresan de manera estable luciferasa de renilla. Seis días después, las células CAR T se descongelaron, se dejaron en reposo durante 24 horas y se transfirieron adoptivamente a los ratones a una dosis de $2x10^6$ células por animal. Los ratones recibieron por vía oral vehículo o 6,85 mg/kg de Compuesto D dos veces al día en los días 0 y 1 (FIG. 19A). Se extrajo sangre y se midió la fluorescencia del tumor en D1, D3 y D10 (FIG. 19A), y se evaluó mediante flujo la proporción de células CAR T+, determinada mediante la tinción con anticuerpos anti-scFv y anti-CD3. La degradación de CAR disminuyó la

expansión y la función citolítica de las células CAR T etiquetadas con degron (FIG. 19B-D), lo que muestra la capacidad del ciclo de CAR para dejar reposar funcionalmente las células CAR T.

7.11. Ejemplo 11: La introducción de una etiqueta de degron en marco permite el control mediado por compuestos de los niveles de proteínas endógenas

[000125] Se exploró la capacidad de introducir etiquetas degron en marco en loci genómicos para permitir la modulación mediada por compuestos de los niveles de proteínas endógenas. Vectores virales adenoasociados se diseñaron para entregar etiquetas IKZF1 ZNF2_3-V5 etiqueta-T2A-muThy1.1 que puedan introducirse en el marco en el locus AURA (FIG. 20A-10B) o TOX (FIG. 20C-20D) en células Jurkat en ambas orientaciones N- y C-terminal. Luego, las Jurkats se sometieron a electroporación con Cas9/ribonucleoproteínas de ARN guía. Después de 5 días, las células introducidas se incubaron con Compuesto A 1 µM o DMSO durante 16 horas. Luego, las células se sedimentaron, lisaron, corrieron en un gel de proteína desnaturalizante, se transfirieron a una membrana, se probaron con anticuerpo y se visualizaron con una película. La transferencia de Western mostró que tanto los niveles Aurora A (FIG. 20A-20B) y los marcados con TOX (FIG. 20D) disminuyen en presencia del Compuesto A, lo que indica que el etiquetado de proteínas endógenas con degron permite el control de moléculas pequeñas de los niveles de proteína.

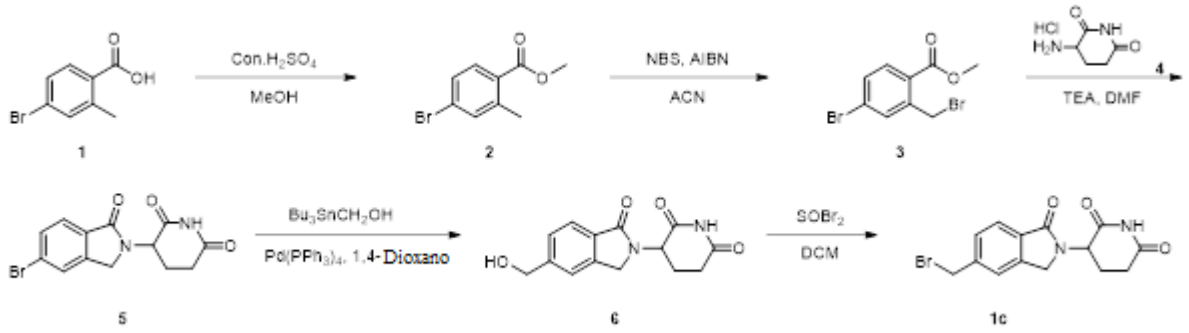
7.12. Ejemplo 12: Síntesis de 3-(5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4-b]piridin-6-carbonil)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona (Compuesto B)



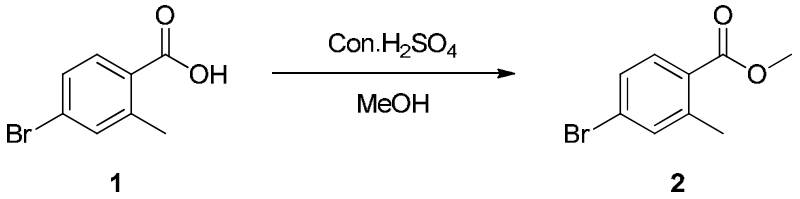
[000126] A una solución de ácido 2-(2,6-dioxo-3-piperidil)-1-oxo-isoindolin-5-carboxílico (400 mg, 1,4 mmol) en CH_3CN (ACN) (5 ml) se añadió hexafluorofosfato de N,N,N′,N′-tetrametilcloroformamidinio (TCFH) (779 mg, 2,8 mmol), N-metilimidazol (NMI) (1,2 g, 14 mmol) y 6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4-b]piridina; dihidroclururo (349 mg, 1,8 mmol). Luego, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se controló por LCMS. Los sólidos precipitados se recolectaron mediante filtración. El producto crudo se purificó mediante Prep-HPLC para producir 3-[5-(5,7-dihidropirrolo[3,4-b]piridin-6-carbonil)-1-oxo-isoindolin-2-

il]piperidina-2, 6-diona (438,7 mg, 79 % de rendimiento) como un sólido de color gris. LC/MS analítico (Método 5): MS[M+H$^+$] 391,1. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 11,03 (s, 1H), 8,54 – 8,43 (m, 1H), 7,94 – 7,65 (m, 4H), 7,41 – 7,23 (m, 1H), 5,23 – 5,11 (m, 1H), 5,00 – 4,75 (m, 4H), 4,62 – 4,36 (m, 2H), 3,04 – 2,84 (m, 1H), 2,69 – 2,56 (m, 1H), 2,50 – 2,36 (m, 1H), 2,12 – 2,00 (m, 1H).

7.13. Ejemplo 13: Síntesis de 3-[5-(bromometil)-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona (Intermedio 1c)

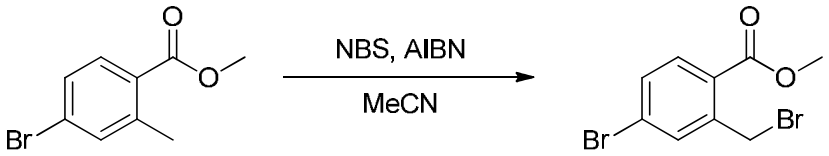


[000127] Síntesis del compuesto 2



A una solución de ácido 4-bromo-2-metil-benzoico (120 g, 558 mmol) en metanol (1,0 l) se añadió ácido sulfúrico concentrado (109 g, 1,12 mol, 60 mL) entre 20 ~ 40 °C, luego la mezcla se calentó a 65 °C durante 18 horas. TLC (éter de petróleo/acetato de etilo = 3:1, Rf (reactivo) = 0,1, Rf (producto) = 0,4) indicó que la reacción había terminado. La mezcla de reacción se concentró; el residuo se separó entre la fase acuosa y la capa orgánica. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (1 L x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con bicarbonato de sodio acuoso saturado (500 ml), salmuera (500 ml) y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró para proporcionar 4-bromo-2-metil-benzoato de metilo (122 g, 95 % de rendimiento) como un aceite amarillo. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,76 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,35 (dd, J = 8,4 Hz, 1,6 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 2,56 (s, 3H)

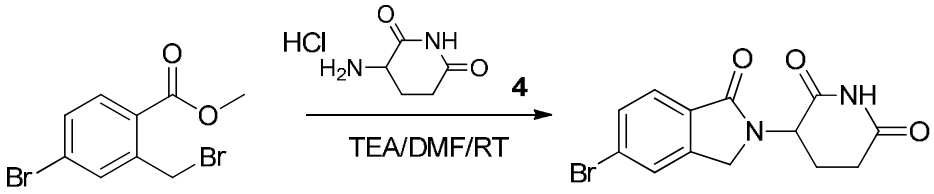
[000128] Síntesis del compuesto 3



2 3

A una solución de 4-bromo-2-metil-benzoato de metilo (122 g, 533 mmol) en acetonitrilo (1,20 l) se añadió 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (6,12 g, 37,3 mmol), la reacción de mezcla se calentó a 82 °C, se añadió en porciones N-bromosuccinimida (142 g, 799 mmol) y se agitó durante 3 h. LCMS indicó que la reacción había terminado. La reacción se concentró al vacío (50 °C). El residuo se suspendió en éter de petróleo/diclorometano (20:1, 100 ml), se filtró y el filtrado se concentró para proporcionar 150 g de producto crudo, que se usó directamente en el siguiente paso sin más purificación.

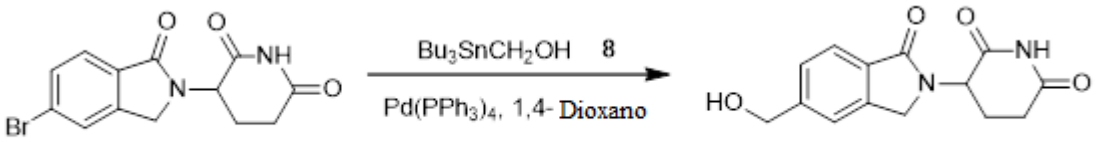
[000129] Síntesis del compuesto 5



3 5

A una solución de 4-bromo-2-(bromometil)benzoato de metilo (115 g, 375 mmol) y 3-aminopiperidina-2,6-diona (61,7 g, 375 mmol, sal HCl) en N,N-dimetilformamida (80 ml) se añadió N,N-diisopropiletilamina (145 g, 1,13 mol). La mezcla se agitó a 50 °C durante 16 horas. La HPLC mostró que se había consumido la mayor parte del material de partida. A la mezcla de reacción se añadió ácido acético (150 ml) y se agitó durante 1 hora a 50 °C. La HPLC mostró que el intermedio se había consumido por completo. La reacción se enfrió a 20 °C y se filtró, la torta de filtro se lavó con agua (200 ml) y acetato de éter (200 ml) para proporcionar 3-(5-bromo-1-oxo-isoindolin-2-il)piperidina-2 ,6-diona (91 g, 75,1 % de rendimiento) como un sólido azul oscuro. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 11,01 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,73-7,66 (m, 2H), 5,14-5,09 (m, 1H), 4,47 (d, J = 16 Hz, 1H), 4,34 (d, J = 16 Hz, 1H), 2,92-2,89 (m, 1H), 2,73-2,58 (m, 1H), 2,41-2,37 (m, 1H), 2,03-1,99 (m, 1H).

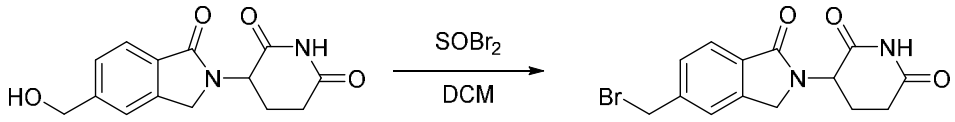
[000130] Síntesis del compuesto 6



5 6

A una solución de 3-(5-bromo-1-oxo-isoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona (80 g, 248 mmol) en dioxano seco (20 ml) se añadió tributilestannilmetanol (87 g, 272 mmol), la mezcla se agitó a 25 °C, se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (28,6 g, 24,8 mmol) a la reacción bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 16 horas. LCMS indicó que la reacción había terminado. La reacción se concentró y se lavó con diclorometano/metanol (10:1, 250 ml x 2) para proporcionar 3-[5-(hidroximetil)-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona (62 g, 91,3 % de rendimiento) como un sólido de color marrón. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 10,96 (s, 1H), 7,64 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,42 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,73 (s, 1H), 5,10-5,06 (m, 1H), 4,59 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 4,35 (dd, J = 17,2 Hz, 54 Hz, 2H), 2,91-2,85 (m, 1H), 2,59-2,55 (m, 1H), 2,38-2,35 (m, 1H), 2,02-1,99 (m, 1H)

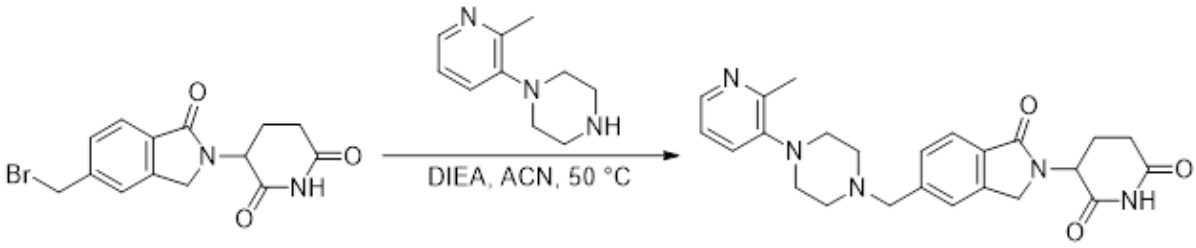
[000131] Síntesis del compuesto 1c



6 **1c**

A una suspensión de 3-[5-(hidroximetil)-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona (62 g, 226 mmol) en diclorometano (1,5 l) se añadió bromuro de sulfinilo (70,5 g, 339 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 18 °C durante 16 horas. La HPLC indicó que la reacción había terminado. La mezcla de reacción se filtró, el sólido se lavó con metanol (150 ml x 2) para proporcionar 3-[5-(bromometil)-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona (45,0 g, 59,0 % de rendimiento) como sólido de color marrón. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 10,97 (s, 1H), 7,70-7,66 (m, 2H), 7,56 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,10-5,06 (m, 1H), 4,80 (s, 2H), 4,36 (dd, J = 54 Hz, 17,2 Hz, 2H), 2,91-2,85 (m, 1H), 2,59-2,49 (m, 1H), 2,47-2,35 (m, 1H), 2,00-1,98 (m, 1H)

7.14. Ejemplo 14: Síntesis de 3-(5-((4-(2-metilpiridin-3-il)piperazin-1-il)metil)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona (Compuesto C)

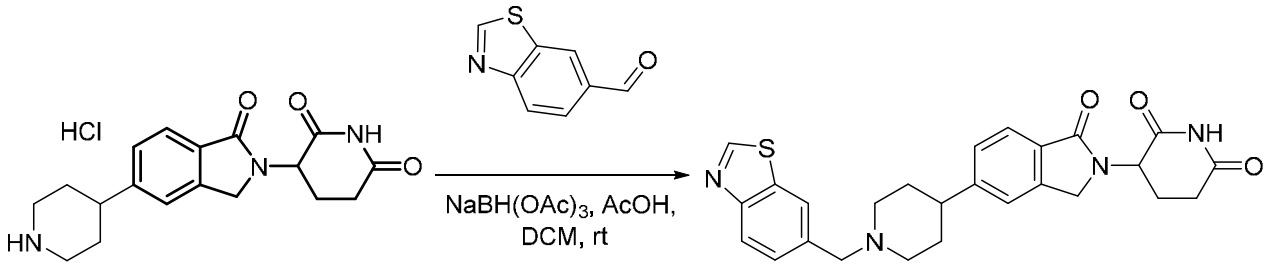


Intermedio 1c **I-10**

[000132] A una solución agitada de 3-[5-(bromometil)-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona (400 mg, 1,2 mmol) en MeCN (ACN) (5 ml) se añadió 1-(2-metil-3-piridil)piperazina

(315 mg, 1,8 mmol) y DIEA (460 mg, 3,6 mmol). La mezcla se agitó a 50 °C durante 3 horas. La reacción se controló por LCMS. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por Prep-HPLC para proporcionar 3-[5-[[4-(2-metil-3-piridil)piperazin-1-il]metil]-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona (187,9 mg, 34 % de rendimiento) como un sólido gris. LC/MS analítico (Método 1): MS[M+H$^+$] 434,2. ^{1}H RMN (400 MHz, Metanol-d_4): δ 8,40 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 8,18 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,93 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,83 – 7,76 (m, 2H), 7,72 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,23 – 5,12 (m, 1H), 4,90 – 4,80 (m, 4H), 4,65 – 4,50 (m, 4H), 3,54 (s, 4H), 2,98 – 2,85 (m, 1H), 2,84 – 2,75 (m, 1H), 2,74 (s, 3H), 2,60 – 2,44 (m, 1H), 2,24 – 2,14 (m, 1H)

7.15. Ejemplo 15: Síntesis de 3-[5-[1-(1,3-benzotiazol-6-ilmetil)-4-piperidil]-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2,6-diona (Compuesto D)



[000133] A una solución agitada de clorhidrato de 3-[1-oxo-5-(4-piperidil)isoindolin-2-il]piperidin-2,6-diona (1,5 g, 4,12 mmol) en DCM (20 mL) se agregó 1,3-benzotiazol-6-carbaldehído (1,35 g, 8,25 mmol) y NaBH(OAc)$_3$ (2,62 g, 12,37 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró y purificó mediante HPLC preparatoria para proporcionar 3-[5-[1-(1,3-benzotiazol-6-ilmetil)-4-piperidil]-1-oxo-isoindolin-2-il]piperidina-2 ,6-diona (968,9 mg, 2,0233 mmol, 49,076 % de rendimiento) como un sólido de color blanco. LCMS: 475,1 [M+1]$^+$. ^{1}H RMN (300 MHz, Metanol-d4): δ 9,40 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,22 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,81-7,71 (m, 2H), 7,55-7,36 (m, 2H), 5,24-5,09 (m, 1H), 4,62-4,39 (m, 4H), 3,76-3,62 (m, 2H), 3,33-3,19 (m, 2H), 3,13-2,99 (m, 1H), 2,95-2,73 (m, 2H), 2,60-2,38 (m, 1H), 2,24-1,95 (m, 5H).

7.16. Ejemplo 16: Selectividad del Compuesto A, Compuesto B, Compuesto C y Compuesto D.

[000134] Las células de mieloma múltiple DF15 que expresan de manera estable Aiolos, Ikaros o GSPT1 etiquetados con ePL, y células MDS-L que expresan de manera estable CK1a marcado con ePL se generaron mediante infección lentiviral con pLOC-ePL-Aiolos (o Ikaros, GSPT1 o CK1a). Las células de mieloma múltiple DF15 que expresan Ikaros, Aiolos y GSPT1 fusionados a una etiqueta ePL (DiscoverX) y las células MDS-L expresando CK1a fusionadas a una etiqueta ePL fueron dispensadas en una placa de 384 pozos (Corning no. 3570) previamente

embebidos con los compuestos (Compuesto A, Compuesto B, Compuesto C y Compuesto D). Los compuestos fueron dispensados mediante un dispensador acústico (sistema de transferencia acústica ATS de EDC Biosystems) en una placa de 384 pozos en una curva de respuesta de dosis de 10 puntos usando una dilución seriada triple empezando en 10 µM hasta llegar a 0,0005 µM. Luego, se dispensaron por pozo 25 µL de medio (RPMI-1640 + FBS inactivado por calor al 10 % + Hepes 25 mM + piruvato de Na 1 mM + 1 × NEAA + 1 × Pen Strep Glutamina) que contenía 5000 células DF15 o MSD-L. Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 4 horas con la excepción de 20 horas para GSPT1. Después de la incubación, se agregaron 25 µL de la solución de trabajo del reactivo de detección InCELL Hunter (DiscoverX, n.º de catálogo 96-0002, Fremont, CA) a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min protegidos de la luz. Después de 60 min, se leyó la luminiscencia en un lector de luminiscencia Envision o PHERAstar.

[000135] Para Helios, una línea celular Jurkat estable fue diseñada utilizando CRISPR/Cas9 para insertar una etiqueta HiBit en el marco de lectura carboxi-terminal del gen IKZF2. Los compuestos de prueba se transfirieron a placas de 1536 pozos utilizando un dispensador acústico, y se sembraron células Jurkat/Helios/HiBit en DMEM/FCS al 10% en placas 10.000 células/pozo en un volumen final de 5 ul. Las células se incubaron a 37 °C, 95 % de HR durante 18 horas. La actividad de luciferasa se midió al agregar 2 ul/pozo de reactivo Nano-Glo (Promega), incubando a temperatura ambiente durante 30 min y leyendo la luminiscencia en un lector de placas de microtitulación.

[000136] Para determinar el valor CE50 de un compuesto para la degradación de un sustrato dado (concentración de compuesto que alcanza la mitad de la degradación máxima observada), se utiliza un modelo logístico de cuatro parámetros (modelo dosis-respuesta sigmoidal) (FIT = (A + {(B − A)/1 + [(C/x)D]})) donde C es el punto de inflexión (CE50), D es el coeficiente de correlación y A y B son los límites inferior y superior del ajuste, respectivamente). Todas las curvas de degradación del sustrato se procesaron y evaluaron utilizando ActivityBase (IDBS), un paquete de software de análisis de datos. Ymin es el porcentaje mínimo de proteína restante.

[000137] Los resultados se muestran en las Tablas 2-5.

Tabla 2: Compuesto A

Degron	Ymin (%)	CE50 (µM)
Q1F	NA	NA
Helios	1,5	0,0018
Aiolos	2,7	0,0064

Ikaros	3,2	0,022
GSPT1	91	0,039
CK1a	50	0,19

Tabla 3: Compuesto B

Degron	Ymin (%)	CE50 (µM)
Q1F (de la Tabla 1)	1,7	0,0048
Helios	65	>10
Aiolos	93	>10
Ikaros	91	>10
GSPT1	72	0,054
CK1a	82	>10

Tabla 4: Compuesto C:

Degron	Ymin (%)	CE50 (µM)
Q1F (de la Tabla 1)	12	0,023
Helios	86	>10
Aiolos	83	>10
Ikaros	92	>10
GSPT1	89	>10
CK1a	98	>10

Tabla 5: Compuesto D

Degron	Ymin (%)	CE50 (µM)
Q1F (de la Tabla 1)	4,2	0,0007
Helios	24	0,46
Aiolos	87	>10
Ikaros	93	>10
GSPT1	96	>10
CK1a	81	>10

[000138] Como se muestra en la Tabla 2, el Compuesto A degradó Helios, Aiolos e Ikaros, con una CE50 de 0,022 µM o menos. El Compuesto A también degradó CK1a en un grado significativo. Por el contrario, el Compuesto B degradó el degron Q1F con una CE50 de menos

de 5 nM en el ensayo Jurkat descrito en el Ejemplo 5. Si bien el Compuesto B mostró cierta actividad de degradación frente a Helios, la CE50 fue >10 µM, que es mayor más de 3 órdenes de magnitud que la CE50 para el degron Q1F (Tabla 3). El Compuesto B también mostró alguna actividad de degradación frente a GSPT1 (Tabla 3). El Compuesto C fue altamente selectivo para el degron Q1F en el ensayo Jurkat descrito en el Ejemplo 5, con una CE50 de menos de 25 nM (Tabla 4). El compuesto D también fue selectivo para el degron Q1F en el ensayo Jurkat descrito en el Ejemplo 5, con una CE50 de menos de 1 nM (Tabla 5), aunque también mostró cierta degradación de Helios, con una CE50 de 0,46 µM (Tabla 5).

EQUIVALENTES

[000139] La presente divulgación no está limitada en su alcance por las modalidades específicas descritas en este documento. De hecho, varias modificaciones de la materia objeto aquí proporcionada, además de las descritas, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Se pretende que tales modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

[000140] En el presente documento se citan diversas publicaciones, patentes y solicitudes de patente, cuyas divulgaciones se incorporan como referencia en su totalidad.

Tabla de ciertas secuencias

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
1	Motivo X1F G consenso 1	$FCX_1X_2CGX_3X_4$
2	Motivo X1F G consenso 2	$FCX_1X_2CGX_3X_4X_5$
3	Motivo G IKZF1 ZNF2 Q1F	FCNQCGAS
4	IKZF1 ZNF2 Q1F	GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS
5	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F consenso	GERPFFCX$_1$X$_2$C GX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCSY ACRRRDALTG HLRTHS
66	IKZF2 ZNF2_ZNF3 Q1F consenso	GERPFFCX$_1$X$_2$C GX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACQRRDALTG HLRTHS
67	IKZF3 ZNF2_ZNF3 Q1F consenso	GERPFFCX$_1$X$_2$C GX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS
68	IKZF4 ZNF2_ZNF3 Q1F consenso	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
6	IKZF1 ZNF2_ZNF3	GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCSY ACRRRDALTG HLRTHS
63	IKZF2 ZNF2_ZNF3	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACQRRDALTG HLRTHS
64	IKZF3 ZNF2_ZNF3	GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS
65	IKZF4 ZNF2_ZNF3	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
7	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCSY ACRRRDALTG HLRTHS
69	IKZF2 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACQRRDALTG HLRTHS
70	IKZF3 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS
71	IKZF4 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCX$_1$X$_2$C GX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCSY ACRRRDALTG HLRTHS
8	Secuencia de nucleótidos IKZF1 ZNF1_ZNF2	ggcattcgac ttcctaacgg aaaactaaag tgtgatatct gtgggatcat ttgcatcggg cccaatgtgc tcatggttca caaaagaagc cacactGGAG AACGGCCCTT CCAGTGCAAT CAGTGCGGGG CCTCATTCAC CCAGAAGGGC AACCTGCTCC GGCACATCAA GCTGCATTCC
9	IKZF1 ZNF1_ZNF2	GIRLPNGKLK CDICGIICIG PNVLMVHKRS HTGERPFQCN QCGASFTQKG NLLRHIKLHS
10	Secuencia de nucleótidos IKZF1 ZNF1_ZNF2_ ZNF3	ggcattcgac ttcctaacgg aaaactaaag tgtgatatct gtgggatcat ttgcatcggg cccaatgtgc tcatggttca caaaagaagc cacactGGAG AACGGCCCTT CCAGTGCAAT CAGTGCGGGG CCTCATTCAC CCAGAAGGGC AACCTGCTCC GGCACATCAA GCTGCATTCC ggggagaagc ccttcaaatg ccacctctgc aactacgcct gccgccggag ggacgccctc actggccacc tgaggacgca ctcc
11	IKZF1 ZNF1_ZNF2_ ZNF3	GIRLPNGKLK CDICGIICIG PNVLMVHKRS HTGERPFQCN QCGASFTQKG NLLRHIKLHS GEKPFKCHLC NYACRRRDAL TGHLRTHS
12	Secuencia de nucleótidos IKZF1 ZNF2_ZNF3	GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC GGGGCCTCAT TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA TTCCggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac gcctgccgcc ggagggacgc cctcactggc cacctgagga cgcactcc
13	IKZF1 ZNF2_ZNF3	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS

14	Secuencia de nucleótidos IKZF1 ZNF2	GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC GGGGCCTCAT TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA TTCC
15	IKZF1 ZNF2	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHS
60	IKZF2 ZNF2	GERPFHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS
61	IKZF3 ZNF2	GERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHT
62	IKZF4 ZNF2	GERPFHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS
16	Secuencia de nucleótidos IKZF1 ZNF2_ZNF3 G6N	GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC aacGCCTCAT TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA TTCCggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac gcctgccgcc ggagggacgc cctcactggc cacctgagga cgcactcc
17	IKZF1 ZNF2_ZNF3 G6N	GERPFQCNQC NASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
18	Secuencia de nucleótidos IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F	ggagaacggc ccttcttctg caatcagtgc ggggcctcat tcacccagaa gggcaacctg ctccggcaca tcaagctgca ttccggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac gcctgccgcc ggagggacgc cctcactggc cacctgagga cgcactcc
19	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
59	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F/G6N	GERPFFCNQC NASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
20	IKZF1 ZNF1 (aminoácidos 117 a 139)	LKCDICGIICIGPNVLMVHKRSH
21	IKZF1 ZNF2 (aminoácidos 145 a 167)	FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLH
22	IKZF1 ZNF3 (aminoácidos 173 a 195)	FKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH
23	IKZF1 ZNF4 (aminoácidos 201 a 224)	HKCGYCGRSYKQRSSLEEHKERCH
24	IKZF1 ZNF5 (aminoácidos 462 a 484)	YKCEHCRVLFLDHVMYTIHMGCH
25	IKZF1 ZNF6 (aminoácidos 490 a 514)	FECNMCGYHSQDRYEFSSHITRGEH
26	IKZF2 ZNF1 (aminoácidos 112 a 134)	LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSH
27	IKZF2 ZNF2 (aminoácidos 140 a 162)	FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLH
28	IKZF2 ZNF3 (aminoácidos 168 a 190)	FKCPFCSYACRRRDALTGHLRTH
29	IKZF2 ZNF4 (aminoácidos 196 a 219)	HKCNYCGRSYKQRSSLEEHKERCH
30	IKZF2 ZNF5 (aminoácidos 471 a 493)	FKCEHCRVLFLDHVMYTIHMGCH
58	IKZF2 ZNF6 (aminoácidos 499 a 523)	LECNICGYRSQDRYEFSSHIVRGEH
31	IKZF3 ZNF1 (aminoácidos 118 a 140)	MNCDVCGLSCISFNVLMVHKRSH
32	IKZF3 ZNF2 (aminoácidos 146 a 168)	FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLH
33	IKZF3 ZNF3 (aminoácidos 174 a 196)	FKCHLCNYACQRRDALTGHLRTH

34	IKZF3 ZNF4 (aminoácidos 202 a 224)	YKCEFCGRSYKQRSSLEEHKERC
35	IKZF3 ZNF5 (aminoácidos 452 a 474)	YRCDHCRVLFLDYVMFTIHMGCH
36	IKZF3 ZNF6 (aminoácidos 480 a 504)	FECNMCGYRSHDRYEFSSHIARGEH
37	IKZF4 ZNF1 (aminoácidos 159 a 181)	LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSH
38	IKZF4 ZNF2 (aminoácidos 187 a 209)	FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLH
39	IKZF4 ZNF3 (aminoácidos 215 a 237)	FKCPFCNYACRRRDALTGHLRTH
40	IKZF4 ZNF4 (aminoácidos 248 a 271)	YKCNYCGRSYKQQSTLEEHKERCH
41	IKZF4 ZNF5 (aminoácidos 530 a 552)	FKCEHCRILFLDHVMFTIHMGCH
42	IKZF4 ZNF6 (aminoácidos 558 a 582)	FECNICGYHSQDRYEFSSHIVRGEH
43	IKZF5 ZNF1 (aminoácidos 82 a 104)	LKCRYCNYASKGTARLIEHIRIH
44	IKZF5 ZNF2 (aminoácidos 110 a 132)	HRCHLCPFASAYERHLEAHMRSH
45	IKZF5 ZNF3 (aminoácidos 138 a 161)	YKCELCSFRCSDRSNLSHHRRRKH
46	IKZF5 ZNF4 (aminoácidos 364 a 386)	HHCQHCDMYFADNILYTIHMGCH
47	IKZF5 ZNF5 (aminoácidos 392 a 416)	FQCNICGCKCKNKYDFACHFARGQH
48	Secuencia de aminoácidos de Ikaros humano	MDADEGQDMS QVSGKESPPV SDTPDEGDEP MPIPEDLSTT SGGQQSSKSD RVVASNVKVE TQSDEENGRA CEMNGEECAE DLRMLDASGE KMNGSHRDQG SSALSGVGGI RLPNGKLKCD ICGIICIGPN VLMVHKRSHT GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHSVGKP HKCGYCGRSY KQRSSLEEHK ERCHNYLESM GLPGTLYPVI KEETNHSEMA EDLCKIGSER SLVLDRLASN VAKRKSSMPQ KFLGDKGLSD TPYDSSASYE KENEMMKSHV MDQAINNAIN YLGAESLRPL VQTPPGGSEV VPVISPMYQL HKPLAEGTPR SNHSAQDSAV ENLLLLSKAK LVPSEREASP SNSCQDSTDT ESNNEEQRSG LIYLTNHIAP HARNGLSLKE EHRAYDLLRA ASENSQDALR VVSTSGEQMK VYKCEHCRVL FLDHVMYTIH MGCHGFRDPF ECNMCGYHSQ DRYEFSSHIT RGEHRFHMS
49	Secuencia de aminoácidos de Aiolos humano	MEDIQTNAEL KSTQEQSVPA ESAAVLNDYS LTKSHEMENV DSGEGPANED EDIGDDSMKV KDEYSERDEN VLKSEPMGNA EEPEIPYSYS REYNEYENIK LERHVVSFDS SRPTSGKMNC DVCGLSCISF NVLMVHKRSH TGERPFQCNQ CGASFTQKGN LLRHIKLHTG EKPFKCHLCN YACQRRDALT GHLRTHSVEK PYKCEFCGRS YKQRSSLEEH KERCRTFLQS TDPGDTASAE ARHIKAEMGS ERALVLDRLA SNVAKRKSSM PQKFIGEKRH CFDVNYNSSY MYEKESELIQ TRMMDQAINN AISYLGAEAL RPLVQTPPAP TSEMVPVISS MYPIALTRAE MSNGAPQELE KKSIHLPEKS VPSERGLSPN NSGHDSTDTD SNHEERQNHI YQQNHMVLSR ARNGMPLLKE VPRSYELLKP PPICPRDSVK VINKEGEVMD VYRCDHCRVL FLDYVMFTIH MGCHGFRDPF ECNMCGYRSH DRYEFSSHIA RGEHRALLK
50	Secuencia de aminoácidos de Helios humano	METEAIDGYI TCDNELSPER EHSNMAIDLT SSTPNGQHAS PSHMTSTNSV KLEMQSDEEC DRKPLSREDE IRGHDEGSSL

		EEPLIESSEV ADNRKVQELQ GEGGIRLPNG KLKCDVCGMV CIGPNVLMVH KRSHTGERPF HCNQCGASFT QKGNLLRHIK LHSGEKPFKC PFCSYACRRR DALTGHLRTH SVGKPHKCNY CGRSYKQRSS LEEHKERCHN YLQNVSMEAA GQVMSHHVPP MEDCKEQEPI MDNNISLVPF ERPAVIEKLT GNMGKRKSST PQKFVGEKLM RFSYPDIHFD MNLTYEKEAE LMQSHMMDQA INNAITYLGA EALHPLMQHP PSTIAEVAPV ISSAYSQVYH PNRIERPISR ETADSHENNM DGPISLIRPK SRPQEREASP SNSCLDSTDS ESSHDDHQSY QGHPALNPKR KQSPAYMKED VKALDTTKAP KGSLKDIYKV FNGEGEQIRA FKCEHCRVLF LDHVMYTIHM GCHGYRDPLE CNICGYRSQD RYEFSSHIVR GEHTFH
51	Secuencia de aminoácidos de Eos humano	MHTPPALPRR FQGGGRVRTP GSHRQGKDNL ERDPSGGCVP DFLPQAQDSN HFIMESLFCE SSGDSSLEKE FLGAPVGPSV STPNSQHSSP SRSLSANSIK VEMYSDEESS RLLGPDERLL EKDDSVIVED SLSEPLGYCD GSGPEPHSPG GIRLPNGKLK CDVCGMVCIG PNVLMVHKRS HTGERPFHCN QCGASFTQKG NLLRHIKLHS GEKPFKCPFC NYACRRRDAL TGHLRTHSVS SPTVGKPYKC NYCGRSYKQQ STLEEHKERC HNYLQSLSTE AQALAGQPGD EIRDLEMVPD SMLHSSSERP TFIDRLANSL TKRKRSTPQK FVGEKQMRFS LSDLPYDVNS GGYEKDVELV AHHSLEPGFG SSLAFVGAEH LRPLRLPPTN CISELTPVIS SVYTQMQPLP GRLELPGSRE AGEGPEDLAD GGPLLYRPRG PLTDPGASPS NGCQDSTDTE SNHEDRVAGV VSLPQGPPPQ PPPTIVVGRH SPAYAKEDPK PQEGLLRGTP GPSKEVLRVV GESGEPVKAF KCEHCRILFL DHVMFTIHMG CHGFRDPFEC NICGYHSQDR YEFSSHIVRG EHKVG
52	Secuencia de aminoácidos de Pegasus humano	MGEKKPEPLD FVKDFQEYLT QQTHHVNMIS GSVSGDKEAE ALQGAGTDGD QNGLDHPSVE VSLDENSGML VDGFERTFDG KLKCRYCNYA SKGTARLIEH IRIHTGEKPH RCHLCPFASA YERHLEAHMR SHTGEKPYKC ELCSFRCSDR SNLSHHRRRK HKMVPIKGTR SSLSSKKMWG VLQKKTSNLG YSRRALINLS PPSMVVQKPD YLNDFTHEIP NIQTDSYESM AKTTPTGGLP RDPQELMVDN PLNQLSTLAG QLSSLPPENQ NPASPDVVPC PDEKPFMIQQ PSTQAVVSAV SASIPQSSSP TSPEPRPSHS QRNYSPVAGP SSEPSAHTST PSIGNSQPST PAPALPVQDP QLLHHCQHCD MYFADNILYT IHMGCHGYEN PFQCNICGCK CKNKYDFACH FARGQHNQH
53	CAR CD19 CD28TM 41BB CD3z	DIQMTQTT SSLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP RGGGEGRGSL LTCGDVEENP G
54	CD28TM 41BB CD3z ZNF2	DIQMTQTT SSLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP

		EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP RTGERPFQCN QCGASFTQKG NLLRHIKLHS GGGEGRGSLL TCGDVEENPG
55	CD28TM 41BB CD3z ZNF1_2	DIQMTQTT SSLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP RGIRLPNGKL KCDICGIICI GPNVLMVHKR SHTGERPFQC NQCGASFTQK GNLLRHIKLH SGGGEGRGSL LTCGDVEENP G
56	CD28TM 41BB CD3z ZNF2_3	DIQMTQTT SSLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP RGERPFQCNQ CGASFTQKGN LLRHIKLHSG EKPFKCHLCN YACRRRDALT GHLRTHSGGG EGRGSLLTCG DVEENPG
57	CD28TM 41BB CD3z ZNF1_2_3	DIQMTQTT SSLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP RGIRLPNGKL KCDICGIICI GPNVLMVHKR SHTGERPFQC NQCGASFTQK GNLLRHIKLH SGEKPFKCHL CNYACRRRDA LTGHLRTHSG GGEGRGSLLT CGDVEENPG
72	Q9UKT9_IKZF3_146_168_23	FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLH
73	Q66K89_E4F1_220_242_23	HECKLCGASFRTKGSLIRHHRRH
74	Q6ZMY9_ZN517_205_227_23	FQCTECGKAFKQSSILLRHQLIH
75	Q6DD87_ZN787_178_200_23	FVCPRCGRGFSQPKSLARHLRLH
76	Q6ZMY9_ZN517_396_418_23	FECAECGKAFGRKSNLTLHQKIH
77	Q96JP5_ZFP91_400_422_23	LQCEICGFTCRQKASLNWHMKKH
78	Q6DD87_ZN787_150_172_23	YTCPDCGRSFTQSKSLAKHRRSH
79	Q96CK0_ZN653_528_550_23	FTCETCGKSFKRKNHLEVHRRTH
80	Q17R98_ZN827_817_839_23	FPCDVCGKVFGRQQTLSRHLSLH
81	Q6DD87_ZN787_317_339_23	HICVECGEGFVQGAALRRHKKIH

82	Q6DD87_ZN787_66_88_23	YICNECGKSFSHWSKLTRHQRTH
83	Q6ZMY9_ZN517_233_255_23	FQCGECGKAFRQSTQLAAHHRVH
84	Q96CK0_ZN653_556_578_23	LQCEICGYQCRQRASLNWHMKKH
85	Q9BU19_ZN692_417_439_23	LQCEICGFTCRQKASLNWHQRKH
86	Q6ZMY9_ZN517_317_339_23	YRCLRCGQRFIRGSSLLKHHRLH
87	Q6ZMY9_ZN517_261_283_23	YACGECGKAFSRSSRLLQHQKFH
88	Q8IZM8_ZN654_25_47_23	FACVICGRKFRNRGLMQKHLKNH
89	Q17R98_ZN827_374_396_23	FQCPICGLVIKRKSYWKRHMVIH
90	Q6ZMY9_ZN517_368_390_23	HECPVCGRPFRHNSLLLLHLRLH
91	Q8N554_ZN276_496_518_23	YICDECGQTFKQRKHLLVHQMRH
92	Q66K89_E4F1_463_485_23	FACAQCGKAFPKAYLLKKHQEVH
93	Q6ZMY9_ZN517_424_446_23	FACTECGKAFRRSYTLNEHYRLH
94	Q96NG8_ZN582_339_361_23	YECKECGKAFNQGSTLIRHQRIH
95	Q8N554_ZN276_524_546_23	LQCEVCGFQCRQRASLKYHMTKH
96	Q6DD87_ZN787_94_116_23	NACADCGKTFSQSSHLVQHRRIH
97	Q6DD87_ZN787_122_144_23	YACLECGKRFSWSSNLMQHQRIH
98	Q6ZMY9_ZN517_289_311_23	FACTECGKAFCRRFTLNEHGRIH
99	Q96NG8_ZN582_283_305_23	YQCKECGKAFNRISHLKVHYRIH
100	Q96NG8_ZN582_395_417_23	YQCKVCGRAFKRVSHLTVHYRIH
101	Q6ZMY9_ZN517_452_474_23	YRCRACGRACSRLSTLIQHQKVH
102	Q9UKT9_IKZF3_118_140_23	MNCDVCGLSCISFNVLMVHKRSH
103	Q96NG8_ZN582_367_389_23	YECKVCGKAFRVSSQLKQHQRIH
104	Q96NG8_ZN582_311_333_23	YACKECGKTFSHRSQLIQHQTVH
105	Q96NG8_ZN582_423_445_23	YECKECGKAFSHCSQLIHHQVIH
106	Q96NG8_ZN582_199_221_23	YKCKECGKAFKYGSRLIQHENIH
107	Q96NG8_ZN582_227_249_23	YECKECGKAFNSGSNFIQHQRVH
108	Q66K89_E4F1_491_513_23	FRCGDCGKLYKTIAHVRGHRRVH
109	Q66K89_E4F1_519_541_23	YPCPKCGKRYKTKNAQQVHFRTH

Reivindicaciones:

1. Un polipéptido diseñado por ingeniería que comprende un dominio de degradación, en donde el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos $FCX_1X_2CGX_3X_4$ (SEC ID NO: 1), en donde:

   X_1 se selecciona de asparagina, aspartato, glicina, glutamina, metionina, histidina, triptófano, isoleucina, arginina, leucina, valina, treonina y fenilalanina.

   X_2 se selecciona de glutamina, arginina, histidina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina, valina y metionina,

   X_3 se selecciona de alanina, serina, cisteína, arginina, leucina, isoleucina, metionina y glicina, y

   X_4 se selecciona de serina, metionina, lisina, isoleucina, valina, histidina, glutamina, arginina, fenilalanina y triptófano.

2. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

   X_1 se selecciona de asparagina, glutamina, metionina, histidina, triptófano, isoleucina, arginina, leucina, valina, treonina y fenilalanina.

   X_2 se selecciona de glutamina, arginina, histidina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina y metionina,

   X_3 se selecciona de alanina, serina, cisteína y glicina, y

   X_4 se selecciona de serina, metionina, histidina, glutamina, arginina, fenilalanina y triptófano.

3. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos $FCX_1X_2CGX_3X_4X_5$ (SEC ID NO: 2), en donde:

   X_5 se selecciona de fenilalanina, triptófano, metionina, arginina, histidina, leucina, tirosina, cisteína y glutamina.

4. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 3, en donde X_5 se selecciona de fenilalanina, triptófano, metionina, arginina, histidina, leucina, tirosina y glutamina.

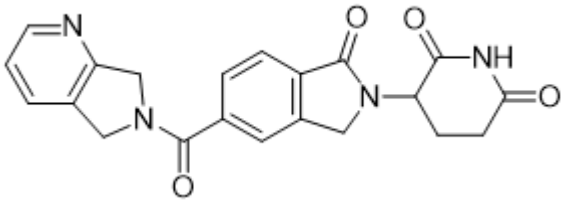
5. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 3 o reivindicación 4, en donde X_5 se selecciona de fenilalanina, triptófano, metionina, leucina, tirosina y glutamina.

6. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 3, en donde X_5 es fenilalanina.

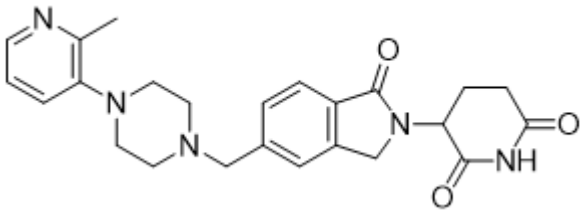
7. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde X_1 es asparagina.
8. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde X_2 es glutamina.
9. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde X_3 es alanina o serina.
10. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 9, en donde X_3 es alanina.
11. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde X_4 es serina.
12. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dominio de degradación comprende la secuencia de aminoácidos FCNQCGAS (SEC ID NO: 3).
13. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el dominio de degradación comprende al menos un dominio tipo dedos de zinc.
14. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el dominio de degradación comprende dos dominios tipo dedos de zinc.
15. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde al menos uno o cada dominio tipo dedos de zinc comprende independientemente una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de las SEC ID NO: 20 a 47 y 58.
16. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% idéntica a los dedos de zinc 2 (ZNF2) de Ikaros, Helios, Aiolos o Eos humano.
17. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el dominio de degradación comprende un segundo dominio tipo dedos de zinc, en donde el segundo dominio tipo dedos de zinc es idéntico en al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % a los dedos de zinc 1 (ZNF1) o ZNF3 de Ikaros, Helios, Aiolos o Eos humano.
18. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a los dedos de zinc 2 (ZNF2) y a los dedos de zinc 3 (ZNF3) de Ikaros, Helios, Aiolos o Eos humano.

19. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de las SEC ID NO: 21, 27, 32 y 38.
20. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de las SEC ID NO: 15, 60, 61 y 62.
21. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de las SEC ID NO: 6, 63, 64 y 65.
22. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
GERPFFCX$_1$X$_2$CGX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 5);
GERPFFCX$_1$X$_2$CGX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCSYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 66);
GERPFFCX$_1$X$_2$CGX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNLLRHIKLHTGEKPFKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 67); y
GERPFFCX$_1$X$_2$CGX$_3$X$_4$X$_5$TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 68).
23. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en donde el dominio de degradación comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 7);
GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCSYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 69);
GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHTGEKPFKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 70); y
GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEC ID NO: 71).

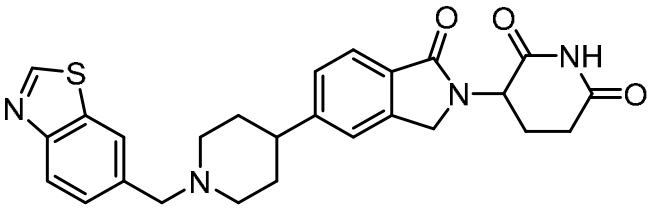
24. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde el polipéptido diseñado se ubiquitina en presencia de un agente de degradación, en donde el agente de degradación es una molécula pequeña que se une al dominio de degradación.
25. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde el polipéptido diseñado se degrada en presencia de un agente de degradación, en donde el agente de degradación es una molécula pequeña que se une al dominio de degradación.
26. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 24 o la reivindicación 25, en donde el agente de degradación también se une a cereblon.
27. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el agente de degradación media un complejo que comprende el dominio de degradación, el agente de degradación y el cereblon.
28. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en donde el agente de degradación es un compuesto seleccionado de:



,



,



,

y tautómeros de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y sales farmacéuticamente aceptables de tautómeros de los mismos.

29. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en donde el polipéptido diseñado se ubiquitina y/o degrada en una célula en presencia del agente de degradación.

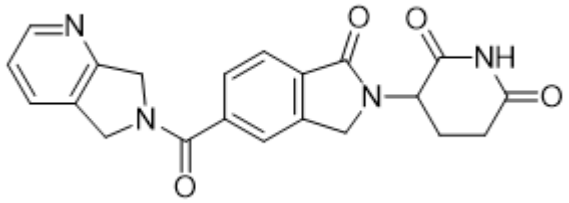
30. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la célula está *in vitro*.
31. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la célula está *in vivo*.
32. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en donde el polipéptido diseñado es sustancialmente citoplásmico o nuclear en una célula, o en donde el polipéptido diseñado comprende un dominio transmembrana.
33. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en donde el dominio de degradación se fusiona con, o se localiza dentro de, una proteína endógena.
34. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 33, en donde la proteína endógena es una proteína de mamífero.
35. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 33, en donde la proteína endógena es una proteína humana.
36. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, en donde la proteína endógena es PRDM1, TGFBR2, CASP8, CBLB, CD5, CISH, CGKA, DGKz, MAP4K1, ARID2, BACH2, CHX37, KLF2, KLF3, KLF6, MAF, SIGLEC9, TOX, ZBTB32, PTPN2, AKT1, PIK3CD, MT1E, MT2A, CSK, ITK, PAG1, PDCD4, ZC3H12A, DNMT1, DNMT3A, PRBM1, STK4, TET2, BNIP3, FAS, CBL, BGAT5, RNF128, STK17B, TRIB1, TXNIP, UBASH3A, BATF, FLI1, IKZF1, IKZF2, IRF4, NFATC1, NR4A1, MAP2K1, MAP2K2, MAP4K4, PPARGC1A, RELB, TMEM173, USP10, MT1A, miembros de la familia PP2A, RASA2, NR4A2, NR4A3, AHR, CD70, LHALS1, SOCS1, SOCS2, SOCS3, TAZ, USP21 o YAP1.
37. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, en donde la actividad biológica de la proteína endógena se retiene sustancialmente en el polipéptido diseñado por ingeniería.
38. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, en donde el polipéptido diseñado por ingeniería comprende un dominio transmembrana.
39. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 38, en donde el dominio transmembrana es el dominio transmembrana de una proteína seleccionada de la cadena alfa del receptor de células T, la cadena beta del receptor de células T, la cadena zeta del receptor de células T, CD28, CD3s, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS, TIM3, LAB3, TIGIT, PD1 o CTLA4.

40. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 38 o la reivindicación 39, en donde el polipéptido diseñado comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular.
41. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el dominio extracelular comprende un ligando, un dominio de unión a ligando o un dominio de unión a antígeno.
42. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 41, en donde el dominio extracelular comprende un dominio de unión a antígeno.
43. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 42, en donde el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno cancerígeno.
44. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 42 o la reivindicación 43, en donde el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno seleccionado de 4-1BB, 5T4, 8H9, B7-H6, antígeno de adenocarcinoma, a-fetoproteína, antígeno de maduración de células B (BCMA), BAFFR, células de linfoma B, antígeno C242, CA9, antígeno carcinoembrionario, CA-125, anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), CCR4, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD23 (receptor de IgE), CD28, CD30 (T FRSF8), CD33, CD38, CD40, CD44v6, CD44v7/8, CD51, CD52, CD56, CD70 CD74, CD80, CD123, CD152, CD171, CD200, CD221, CE7, CEA, C-MET, CLAUDIN6, CLAUDIN18.3, CNT0888, CTLA-4, DRS, EpCAM, ErbB2, ErbB3/4, EGFR, EGFRγIII, EphA2, EGP2, EGP40, FAP, AchR fetal, dominio B extra de fibronectina, receptor de folato a, receptor de folato 1, G250/CAIX, GD2, GD3, glicoproteína 75, GP MB, HER2/neu, HGF, HLA-AI MAGE Al, HLA-A2 NY-ESO-1, HMW-MAA, quinasa del receptor del factor de dispersión humano, receptor IGF-1, IGF-I, IgGl, IL-6, IL-13, receptor a2 de IL-13, receptor a de IL-11, receptor I del factor de crecimiento tipo insulina, integrina a5I31, integrina avI33, cadena ligera kappa, Ll-CAM, cadena ligera lambda, Lewis Y, mesotelina, MORAb-009, MS4A1, MUCl, MUCl 6, mucina CanAg, NCAM, ácido N-glicolilneuramínico, ligandos NKG2D, NPC-IC, PDGF-R a, PDL192, fosfatidilserina, antígeno prostático específico del cáncer (PSCA), células de carcinoma prostático, PSMA, PSC1, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, spl7, TAG72, tenascina C, TGF β2, TGF-I3, TL1A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, antígeno tumoral CTAA16.88, UPK1B, VEGF-A, receptores de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, TEM1, TEM8 y/o vimentina.
45. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo y una región variable de cadena ligera de anticuerpo.

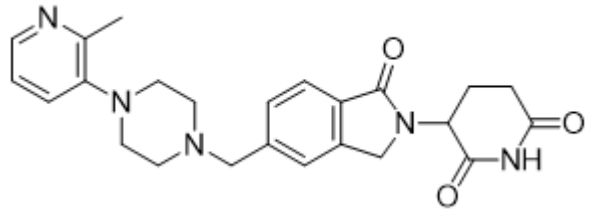
46. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un scFv.
47. El polipéptido diseñado de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un dominio de unión a antígeno de anticuerpo de dominio único.
48. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 47, en donde el dominio intracelular comprende al menos un dominio coestimulador.
49. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 48, en donde el dominio intracelular comprende dos dominios coestimuladores.
50. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 48 o la reivindicación 49, en donde al menos un dominio coestimulador es un dominio coestimulador de una proteína receptora seleccionada de 4-1BB (CD137), CD28, OX40, un receptor activador de células K, BTLA, un receptor de ligando Toll, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CDS, ICAM-L LFA-1 (CD1 la/CD18), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), RANK, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, Kp80 (KLRF1), Kp44, Kp30, Kp46, CD 19, CD4, CD8a, CD8p, IL2Rp, IL2Ry, IL7Ra, ITGA4, VLAl, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDl ld, ITGAE, CD103, ITGAL, CDl la, LFA-1, ITGAM, CDl lb, ITGAX, CDl lc, ITGB 1, CD29, ITGB2, IL15Ra, IL7R, CD18, CD132, LFA-1, ITGB7, KG2D, KG2C, T FR2, TRANCE/RA KL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD 160 (BY55), PSGL1, CD 100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD 150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, DAP10, DAP 12, un ligando de CD83, una molécula MHC de clase I, una proteína receptora de TNF, una proteína de tipo inmunoglobulina, un receptor de citoquinas, una integrina y/o una molécula de activación linfocítica de señalización.
51. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 48 o la reivindicación 49, en donde el polipéptido diseñado por ingeniería comprende un dominio coestimulador 4-1BB.
52. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 40 a 51, en donde el dominio intracelular comprende al menos un dominio de señalización.
53. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 52, en donde al menos un dominio de señalización es un dominio de señalización de motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM).

54. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 52 o la reivindicación 53, en donde al menos un dominio de señalización es un dominio de señalización de una proteína receptora seleccionada de CD3ε, CD3ζ, CD3η, FcRγ, FcRβ, CD3δ, CD3γ, CD5, CD22, CD20, CD79a, CD79b, CD278 (ICOS), FcERI, CD66d, DAP10 y DAP12.
55. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 54, en donde el dominio intracelular comprende un dominio de señalización de CD3ζ.
56. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 40 a 55, en donde el polipéptido diseñado comprende, desde el extremo amino hasta el extremo carboxi, (i) un dominio extracelular [ECD] – un dominio transmembrana [TM] – un dominio coestimulador [CoD] – un dominio de señalización [SigD] – un dominio de degradación [DD]; o (2) ECD-TM-CoD-DD-SigD; o (3) ECD-TM-DD-CoD-SigD.
57. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 40 a 56, en donde el polipéptido diseñado es un receptor de antígeno quimérico (CAR).
58. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 57, en donde el polipéptido diseñado comprende uno o más enlazadores peptídicos entre uno o más dominios.
59. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 58, en donde el polipéptido diseñado está comprendido en una célula.
60. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 59, en donde la célula es una célula efectora humana.
61. El polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 60, en donde la célula es una célula T o una célula NK.
62. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 61.
63. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 62.
64. Una célula que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 62 o el vector de acuerdo con la reivindicación 63.
65. Una célula que comprende el polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 61.
66. La célula de acuerdo con la reivindicación 64 o la reivindicación 65, en donde la célula es una célula efectora humana.
67. La célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 64 a 66, en donde la célula es una célula T o una célula NK.

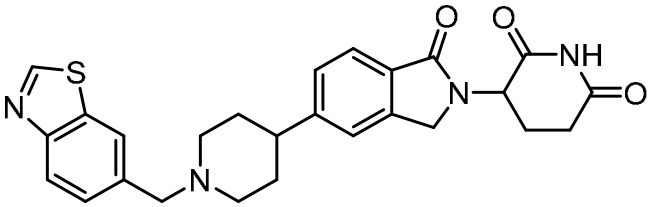
68. La célula de la reivindicación 67, en donde la célula es una célula T.
69. La célula de acuerdo con la reivindicación 68, en donde la célula es una célula T efectora.
70. La célula de acuerdo con la reivindicación 68, en donde la célula es una célula T CD4+ o una célula T CD8+.
71. Una composición farmacéutica que comprende la célula de cualquiera de las reivindicaciones 64 a 70.
72. Un método para reducir el nivel del polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 61, que comprende poner en contacto el polipéptido diseñado por ingeniería con un agente de degradación seleccionado de:



,



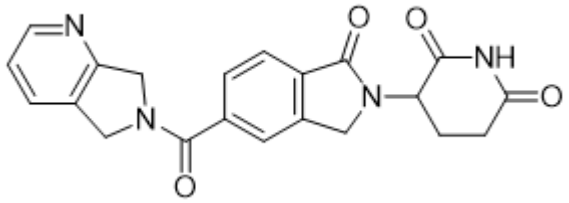
,



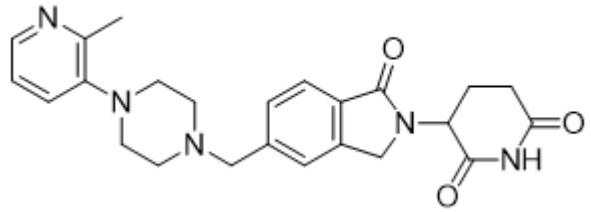
,

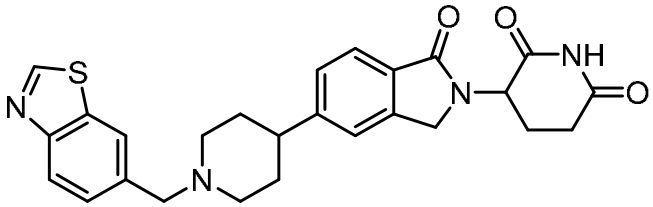
y tautómeros de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de tautómeros de los mismos.

73. Un método para reducir el nivel de un polipéptido diseñado por ingeniería en una célula, que comprende poner en contacto la célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 64 a 70 con un agente de degradación seleccionado de:



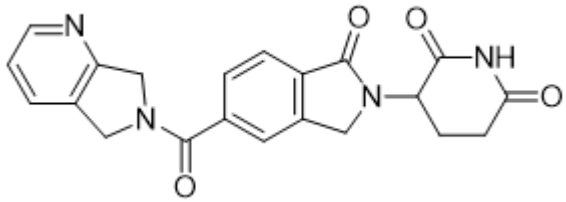
,

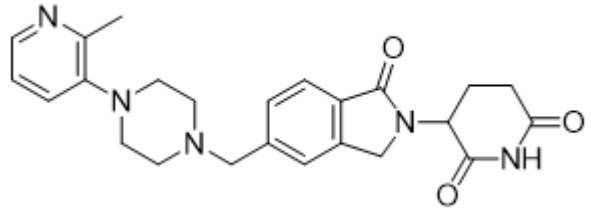

,

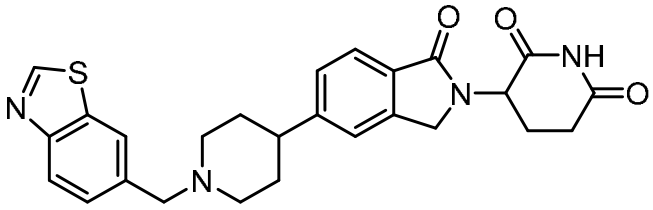

,

y tautómeros de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de tautómeros de los mismos.

74. Un método para reducir el nivel de un polipéptido diseñado por ingeniería en una célula de un sujeto, que comprende administrar al sujeto un agente de degradación seleccionado de:


,


,


,

y tautómeros de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de tautómeros de los mismos, en donde la célula comprende el polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 61.

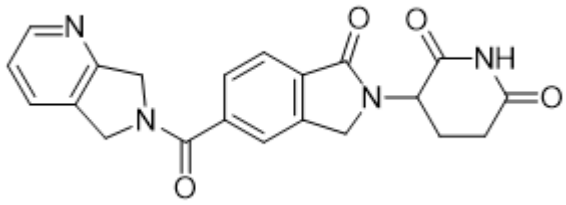
75. El método de acuerdo con la reivindicación 74, en donde la célula es una célula efectora humana.

76. El método de acuerdo con la reivindicación 74 o la reivindicación 75, en donde la célula es una célula T o una célula NK.

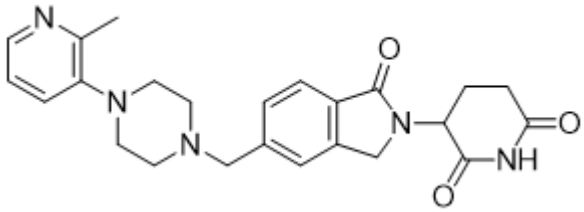
77. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 72 a 76, en donde el polipéptido diseñado se ubiquitina en presencia del agente de degradación.
78. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 72 a 77, en donde el polipéptido diseñado se degrada en presencia del agente de degradación.
79. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 72 a 78, en donde el agente de degradación se une al dominio de degradación.
80. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 72 a 79, en donde el agente de degradación también se une a cereblon.
81. El método de acuerdo con la reivindicación 80, en donde el agente de degradación media un complejo que comprende el dominio de degradación, el agente de degradación y el cereblon.
82. Un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 64 a 70.
83. El método de acuerdo con la reivindicación 82, en donde la célula es una célula T.
84. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en donde la célula es una célula T efectora.
85. El método de acuerdo con la reivindicación 83, en donde la célula es una célula T CD4+ o una célula T CD8+.
86. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 82 a 85, en donde la célula comprende el polipéptido diseñado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 57.
87. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 82 a 86, en donde la enfermedad o trastorno es cáncer.
88. El método de acuerdo con la reivindicación 87, en donde el cáncer se selecciona de un cáncer hematológico o un cáncer sólido.
89. El método de acuerdo con la reivindicación 88, en donde el cáncer hematológico es leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena crónica (LMC), un linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple o un síndrome mielodisplásico.
90. El método de acuerdo con la reivindicación 88, en donde el cáncer sólido es cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de útero, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de recto, cáncer de laringe y cáncer de esófago.
91. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 82 a 90, en donde antes de administrar la célula al sujeto, la célula se pone en contacto *ex vivo* con un agente de

degradación, en donde el agente de degradación es una molécula pequeña que se une al dominio de degradación.

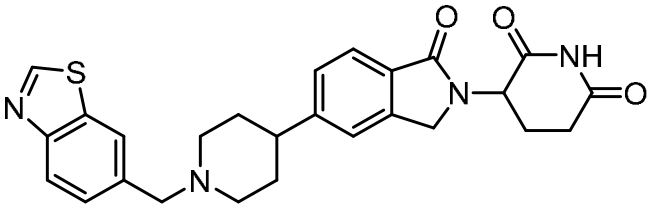
92. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 82 a 90, en donde el método comprende administrar la célula al sujeto con un agente de degradación, en donde el agente de degradación es una molécula pequeña que se une al dominio de degradación.
93. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 82 a 90, en donde después de administrar la célula al sujeto, el método comprende administrar un agente de degradación, en donde el agente de degradación es una molécula pequeña que se une al dominio de degradación.
94. El método de cualquiera de las reivindicaciones 91 a 93, en donde el agente de degradación es un compuesto seleccionado a partir de:



,



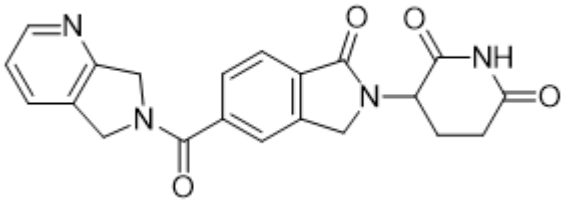
,



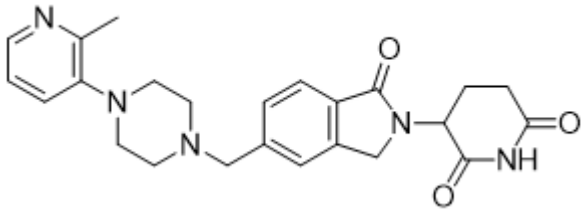
,

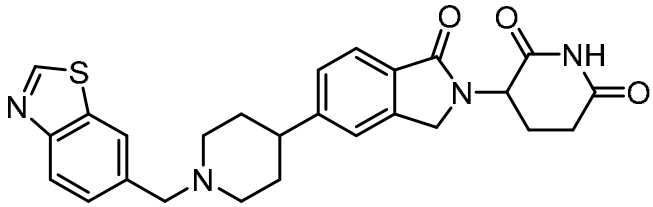
y tautómeros de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y sales farmacéuticamente aceptables de tautómeros de los mismos.

95. Un compuesto seleccionado a partir de:



,


,


,

y tautómeros de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y sales farmacéuticamente aceptables de tautómeros de los mismos.

96. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 95 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

RESUMEN

La presente descripción se refiere a polipéptidos diseñados por ingeniería que comprenden dominios de degradación, compuestos, composiciones y métodos para su preparación y uso en la degradación de proteínas diseñadas por ingeniería en células.