

RECEPTORES DE UNIÓN AL ANTÍGENO MEJORADOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en general, a receptores de unión al antígeno humanizados capaces de unirse específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU. La presente invención también se refiere a linfocitos T, transducidos con un receptor de unión al antígeno que se recluta mediante unión y/o interacción específica con el dominio Fc mutado de anticuerpos terapéuticos.

ANTECEDENTES

El tratamiento adoptivo de linfocitos T (ACT) es un potente enfoque de tratamiento que usa linfocitos T específicos para el cáncer (Rosenberg y Restifo, *Science* 348(6230) (2015), 62-68). El ACT puede usar células específicas de tumores naturales o linfocitos T convertidos en específicos mediante modificación por ingeniería genética usando receptores de antígenos quiméricos o de linfocitos T (Rosenberg y Restifo, *Science* 348(6230) (2015), 62-68). El ACT puede tratar con éxito e inducir la remisión en pacientes que padecen incluso enfermedades avanzadas y de otro modo refractarias al tratamiento, como la leucemia linfática aguda, el linfoma no Hodgkin o el melanoma (Dudley *et al.*, *J Clin Oncol* 26(32) (2008), 5233-5239; Grupp *et al.*, *N Engl J Med* 368 (16) (2013), 1509-1518; Kochenderfer *et al.*, *J Clin Oncol.* (2015) 33(6):540-549, doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025. Epub 25 de agosto, 2014).

Sin embargo, a pesar de la impresionante eficacia clínica, el ACT está limitado por las toxicidades relacionadas con el tratamiento. La especificidad, y los efectos resultantes en la diana y fuera de la diana, de los linfocitos T modificados por ingeniería genética usados en el ACT dependen principalmente de la porción de unión al antígeno que actúa sobre el tumor implementada en los receptores de unión al antígeno. La expresión no exclusiva del antígeno tumoral o la diferencia temporal en el nivel de expresión puede dar lugar a efectos secundarios graves o incluso al aborto de ACT debido a la toxicidad no tolerable del tratamiento.

Además, la disponibilidad de linfocitos T específicos del tumor para una lisis eficiente de las células tumorales depende de la capacidad de supervivencia y proliferación a largo plazo de los linfocitos T modificados por ingeniería genética *in vivo*. Por otro lado, la supervivencia y la proliferación *in vivo* de linfocitos T también puede dar lugar a efectos no deseados a largo plazo debido a la persistencia de una respuesta no controlada de linfocitos T que puede provocar daños en el tejido sano (Grupp *et al.* 2013 *N Engl J Med*

368(16):1509-18, Maude *et al.* 2014 2014 N Engl J Med 371(16):1507-17).

Un enfoque para limitar las toxicidades graves relacionadas con el tratamiento y para mejorar la seguridad del ACT es restringir la activación y la proliferación de los linfocitos T mediante la introducción de moléculas adaptadoras en la sinapsis inmunitaria. Tales moléculas adaptadoras comprenden pequeños interruptores moleculares bimodulares como, por ejemplo, el recientemente descrito interruptor folato-FITC (Kim *et al.* J Am Chem Soc 2015; 137:2832-2835). Otro enfoque incluía anticuerpos modificados artificialmente que comprendían una etiqueta para guiar y dirigir la especificidad de los linfocitos T para dirigirse a las células tumorales (Ma *et al.* PNAS 2016; 113(4):E450-458, Cao *et al.* Angew Chem 2016; 128:1-6, Rogers *et al.* PNAS 2016; 113(4):E459-468, Tamada *et al.* Clin Cancer Res 2012; 18(23):6436-6445).

Sin embargo, los enfoques existentes tienen varias limitaciones. Las sinapsis inmunitarias que se basan en interruptores moleculares requieren la introducción de elementos adicionales que podrían provocar una respuesta inmunitaria o dar lugar a efectos no específicos fuera de la diana. Además, la complejidad de tales sistemas multicomponentes puede limitar la eficacia y la tolerabilidad del tratamiento. Por otra parte, la introducción de la estructura de la etiqueta en los anticuerpos monoclonales terapéuticos existentes puede afectar el perfil de eficacia y seguridad de estos constructos. Además, la adición de etiquetas requiere etapas adicionales de modificación y purificación, lo que hace que la producción de dichos anticuerpos sea más compleja y requiera pruebas adicionales de seguridad.

Además, el uso *in vivo* de anticuerpos no humanos o parcialmente humanos puede dar lugar a la formación de anticuerpos antifármaco (ADA), que incluyen los anticuerpos antiidiotípicos o anti-ratón humano (HAMA) (Blanco *et al* Clin Immunol 17, 96-106 (1997)). Estos ADA pueden afectar las propiedades farmacocinéticas, la seguridad y la funcionalidad de los anticuerpos administrados, por lo que se ha aplicado la humanización para abordar este problema (Carter *et al* PNAS 89, 4285-4289 (1992)). De manera similar, se han observado ADA para los linfocitos T-CAR a base de ratones: Aunque se sabe que se desarrollan anticuerpos IgG anti-ratón humano con linfocitos T transducidos mediante CAR, se cree que no tienen consecuencias clínicas adversas. Maus *et al* describieron por primera vez la anafilaxia resultante de los linfocitos T modificados mediante CAR, muy probablemente a través de anticuerpos IgE específicos de los CAR. Estos resultados indican que la potencial inmunogenicidad de los receptores de unión al antígeno derivados de anticuerpos murinos puede ser un problema de seguridad, especialmente cuando se administran usando un cronograma de dosis intermitente (Maus *et al* Cancer Immunol Res 1, 26-31 (2013)). En consecuencia, el

tratamiento tumoral dirigido, en particular el tratamiento adoptivo de linfocitos T, debe mejorarse para satisfacer las necesidades de los pacientes con cáncer. De este modo, sigue siendo necesario proporcionar medios mejorados que tengan el potencial de mejorar la seguridad y la eficacia del ACT y superar las desventajas anteriores.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona receptores de unión al antígeno con propiedades mejoradas, en particular receptores de unión al antígeno humanizado que son estables y altamente expresados en células transducidas.

En la presente se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129. En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129. En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132. En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132. En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132.

En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno no comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19

En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica el receptor de unión al antígeno como se describe anteriormente en la presente.

En una forma de realización, el polinucleótido aislado comprende la secuencia de SEQ ID NO:130.

En una forma de realización, el polinucleótido aislado comprende la secuencia de SEQ ID NO:133.

En una forma de realización, se proporciona un polipéptido codificado por el polinucleótido aislado como se describe anteriormente en la presente.

En una forma de realización, se proporciona un vector, en particular un vector de expresión, que comprende el polinucleótido como se describe anteriormente en la presente.

En una forma de realización, se proporciona un linfocito T transducido que comprende el polinucleótido o el vector como se describe anteriormente en la presente.

En una forma de realización, se proporciona un linfocito T transducido capaz de expresar el receptor de unión al antígeno como se describe anteriormente en la presente.

En una forma de realización, se proporciona un kit que comprende

- (A) un linfocito T transducido que puede expresar el receptor de unión al antígeno como se describe anteriormente en la presente; y
- (B) un anticuerpo que se une a un antígeno de célula diana y que comprende un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU.

En una forma de realización, se proporciona un kit que comprende

- (A) un polinucleótido aislado que codifica el receptor de unión al antígeno como se describe anteriormente en la presente; y
- (B) un anticuerpo que se une a un antígeno de célula diana y que comprende un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU.

En una forma de realización, se proporciona un kit que comprende

- (A) el polinucleótido aislado o el vector como se describe anteriormente en la presente; y
- (B) un anticuerpo que se une a un antígeno de célula diana y que comprende un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU.

En una forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 o de IgG4, en particular un dominio Fc de IgG1 humana.

En una forma de realización, el antígeno de célula diana se selecciona del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP), antígeno carcinoembrionario (CEA), mesotelina (MSLN), CD20, receptor de folato 1 (FOLR1) y tenascina (TNC).

En una forma de realización, se proporciona el kit como se describe anteriormente en la presente para su uso como un medicamento.

En una forma de realización, se proporciona el receptor de unión al antígeno o el linfocito T transducido como se describe anteriormente en la presente para su uso como un medicamento, en donde se administra un linfocito T transducido que expresa el receptor de unión al antígeno antes, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo que se une a un antígeno de célula diana, en particular, un antígeno de célula cancerosa, y que comprende un dominio Fc que comprende la mutación aminoacídica P329G de acuerdo con la numeración EU.

En una forma de realización, se proporciona el kit como se describe anteriormente en la presente para su uso en el tratamiento de una enfermedad, en particular, para su uso en

el tratamiento de un tipo de cáncer.

En una forma de realización, se proporciona el receptor de unión al antígeno o el linfocito T transducido como se describe anteriormente en la presente para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el tratamiento comprende la administración de un linfocito T transducido que expresa el receptor de unión al antígeno antes, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo que se une a un antígeno de célula cancerosa, y que comprende un dominio Fc que comprende la mutación aminoacídica P329G de acuerdo con la numeración EU.

En una forma de realización, dicho cáncer se selecciona de cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y cáncer de la sangre.

En una forma de realización, el antígeno de cáncer se selecciona del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP), antígeno carcinoembrionario (CEA), mesotelina (MSLN), CD20, receptor de folato 1 (FOLR1) y tenascina (TNC).

En una forma de realización, el linfocito T transducido se deriva de una célula aislada del sujeto a tratar.

En una forma de realización, el linfocito T transducido no se deriva de una célula aislada del sujeto a tratar.

En una forma de realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un linfocito T transducido capaz de expresar el receptor de unión al antígeno como se describe anteriormente en la presente y administrar antes, en simultáneo con o después de la administración del linfocito T transducido una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une a un antígeno de célula diana y que comprende un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU.

En una forma de realización, el método comprende adicionalmente aislar un linfocito T del sujeto y generar el linfocito T transducido al transducir el linfocito T aislado con el polinucleótido o el vector como se describe anteriormente en la presente.

En una forma de realización, el linfocito T se transduce con un constructo de vector retroviral o lentiviral, o con un constructo de vector no viral.

En una forma de realización, el linfocito T transducido se administra al sujeto mediante infusión intravenosa.

En una forma de realización, el linfocito T transducido se pone en contacto con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 antes de su administración al sujeto.

En una forma de realización, el linfocito T transducido se pone en contacto con al menos una citocina antes de su administración al sujeto, preferentemente, con interleucina 2 (IL-2), interleucina 7 (IL-7), interleucina 15 (IL-15) y/o interleucina 21, o variantes de estas.

En una forma de realización, la enfermedad es cáncer.

En una forma de realización, el cáncer se selecciona de cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y cáncer de la sangre.

En una forma de realización, se proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana, que comprende poner en contacto la célula diana con un linfocito T transducido capaz de expresar el receptor de unión al antígeno como se describe anteriormente en la presente en presencia de un anticuerpo que se une a un antígeno de célula diana y que comprende un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU.

En una forma de realización, la célula diana es una célula cancerosa.

En una forma de realización, la célula diana expresa un antígeno seleccionado del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP), antígeno carcinoembrionario (CEA), mesotelina (MSLN), CD20, receptor de folato 1 (FOLR1) y tenascina (TNC).

En una forma de realización, se proporciona el uso del receptor de unión al antígeno, el polinucleótido o el linfocito T transducido como se describe anteriormente en la presente para la elaboración de un medicamento.

En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de cáncer.

En una forma de realización, dicho cáncer se selecciona de cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y cáncer de la sangre.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1: Representación esquemática del receptor quimérico de unión al antígeno de segunda generación con la porción de unión anti-P329G en formato scFv. En la orientación VH x VL scFv (figura 1A) y VL x VH (figura 1B). Las figuras 1C y 1D muestran constructos de ADN que codifican los receptores de unión al antígeno representados en las figuras 1A y 1B, respectivamente.

FIGURA 2: se representa la expresión en la superficie de CAR de diferentes variantes de scFv humanizadas (figura 2A) y la expresión correlativa de GFP que sirve de control de transducción (figura 2B).

FIGURA 3: Evaluación de la señalización inespecífica de linfocitos T indicadores Jurkat CAR anti-P329G empleando diferentes versiones humanizadas del aglutinante P329G como porción de unión. La activación se evaluó mediante la cuantificación de la intensidad de la señalización corriente abajo de CD3 usando el ensayo indicador Jurkat-NFAT CAR anti-P329G, ya sea en presencia de anticuerpos que poseen diferentes variantes de Fc o con variantes de Fc P329G pero sin células diana. Se representa el

promedio de los valores técnicos de los triplicados, las barras de error indican la SD.

FIGURA 4: Activación de linfocitos T indicadores Jurkat CAR anti-P329G empleando diferentes versiones humanizadas del aglutinante P329G en presencia de células diana FolR1⁺ con niveles de expresión diana altos (HeLa-FolR1), medios (Skov3) y bajos (HT29) en combinación con anticuerpos que poseen afinidades altas (16D5), medias (16D5 W96Y) o bajas (16D5 G49S/K53A) hacia FolR1. La activación se evaluó mediante la cuantificación de la intensidad de la señalización corriente abajo de CD3 usando el ensayo indicador Jurkat-NFAT CAR anti-P329G. Se representa el promedio de los valores técnicos de los triplicados, las barras de error indican la SD.

FIGURA 5: Activación de linfocitos T indicadores NFAT Jurkat CAR anti-P329G empleando diferentes versiones humanizadas del aglutinante P329G como porción de unión. La actividad de las células indicadoras se evaluó en presencia de IgG1 P329G anti-FolR1 (16D5) dirigida a las células diana IgG y HeLa (FolR1⁺) (figura 5A). La activación dependiente de la dosis del anticuerpo se evaluó mediante la cuantificación de la intensidad de la señalización corriente abajo de CD3 usando el ensayo indicador Jurkat-NFAT CAR anti-P329G y se calculó el área bajo la curva (figura 5B). Se representa el promedio de los valores técnicos de los triplicados, las barras de error indican la SD.

FIGURA 6: Activación de linfocitos T indicadores NFAT Jurkat CAR anti-P329G empleando diferentes versiones humanizadas del aglutinante P329G como porción de unión. Se evaluó la actividad de las células indicadoras en presencia de IgG1 P329G anti-HER2 (Pertuzumab) dirigida a las células diana IgG y HeLa (HER2⁺) (figura 6A). La activación dependiente de la dosis del anticuerpo se evaluó mediante la cuantificación de la intensidad de la señalización corriente abajo de CD3 usando el ensayo indicador Jurkat-NFAT CAR anti-P329G y se calculó el área bajo la curva (figura 6B). Se representa el promedio de los valores técnicos de los triplicados, las barras de error indican la SD.

FIGURA 7: se representa la expresión en la superficie de CAR de la variante de scFv VHxVL1 estabilizada mediante disulfuro.

FIGURA 8: Representación esquemática del constructo de CAR HuR968B y HuR9684M. Para el constructo HuR9684M que utiliza IgG4M-CD28TM-CD28CSD-CD3z y para HuR968B G4S-CD8TM-4-1BBCSD-CD3z.

FIGURA 9: Se representa la expresión de HuR968B y HuR9684M en células HEK293T, detectadas mediante citometría de flujo.

FIGURA 10: Los datos de citometría de flujo representativa que muestran la expresión de los constructos de PG CAR HuR968B y HuR9684M respectivos (figura 9A) y el control no

transducido (figura 9A). Los rangos de expresión de CAR totales varían entre 18 % y 36 %.

FIGURA 11: Se demuestra el efecto de inactivación de PG CAR con el uso de constructos HuR968B, HuR9684M y las células 8E5 CAR-T convencionales medidas mediante xCELLigence. A medida que se utilizaron las células Claudine 18.2 diana que expresan células tumorales DAN-G18.2 y se evaluaron con linfocitos T (PCH20201100004) donantes que expresan HuR9684M o HuR968B PG CAR. A medida que se utilizaron la relación E:T 1:2 y la concentración de anticuerpo IgG de 100 ng/ml P329G Claudin 18.2 A6.

FIGURA 12: Muestra el efecto inactivador de las células HuR968B CAR-T en combinación con diferentes concentraciones de A6 o Zmab PG IgG medidas mediante la liberación de LDH. DAN-G18.2 que expresa CLDN18.2 se utilizó como células diana y las células HuR968B CAR-T se usaron como células efectoras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

En la presente se usan términos como generalmente se usan en el estado de la técnica, a menos que se definan de otro modo a continuación.

Una "estructura aceptora humana", a los fines de la presente, es una estructura que comprende la secuencia de aminoácidos de una estructura de dominio variable de la cadena liviana (VL) o una estructura de dominio variable de la cadena pesada (VH) derivado de una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humano, como se define más adelante. Una estructura aceptora humana "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de estos o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos aspectos, la cantidad de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunos aspectos, la estructura aceptora humana de VL tiene una secuencia idéntica con respecto a la secuencia estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia estructural de consenso humana de VL.

Un "receptor Fc de activación" es un receptor Fc que, tras el acoplamiento por parte de un dominio Fc de un anticuerpo, provoca eventos de señalización que estimulan la célula que porta el receptor a que realice funciones efectoras. Los receptores Fc de activación humanos incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89).

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" ("ADCC") es un mecanismo inmunitario que conduce a la lisis de células diana recubiertas con anticuerpo

por parte de células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las cuales se unen específicamente anticuerpos o derivados de estos que comprenden una región Fc, en general por medio de la parte de la proteína que está en el N terminal con respecto a la región Fc. Como se usa en la presente, la expresión "ADCC reducida" se define como una reducción en la cantidad de células diana que se lisan en un momento determinado, en una concentración determinada de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, mediante el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o un aumento en la concentración de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, necesario para lograr la lisis de una cantidad determinada de células diana en un momento determinado, mediante el mecanismo de ADCC. La reducción de ADCC es relativa con respecto a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células huésped, mediante el uso de los mismos métodos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándares (son conocidos por los expertos en el estado de la técnica), pero que no se ha genomanipulado. Por ejemplo, la reducción de ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución de aminoácidos que reduce la ADCC es relativa con respecto a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución de aminoácido en el dominio Fc. En el estado de la técnica se conocen ensayos adecuados para medir la ADCC (ver, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 2006/082515 o la publicación PCT N.º WO 2012/130831).

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad que es eficaz, en dosis y por períodos necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su componente de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en la presente descripción, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X a su componente Y puede representarse en general con la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en el estado de la técnica, que incluyen aquellos descritos en la presente descripción. Los métodos ilustrativos y de ejemplo específicos para medir la afinidad de unión se describen más adelante.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y aminoácidos sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que luego se modifican, por

ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un α carbono unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metilsulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras de péptido modificadas, pero mantienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido natural. Se puede hacer referencia a los aminoácidos en la presente ya sea por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

Como se usa en la presente, la expresión "mutación de aminoácido" pretende abarcar sustituciones, eliminaciones, inserciones y modificaciones de aminoácidos. Se puede llegar a cualquier combinación de sustitución, eliminación, inserción y modificación en el constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a un receptor Fc o asociación aumentada con otro péptido. Las eliminaciones e inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen eliminaciones e inserciones de aminoácidos en el extremo amino y/o carboxi. Las mutaciones de aminoácidos particulares son sustituciones de aminoácidos. Con el fin de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, se prefieren en particular las sustituciones de aminoácidos no conservadoras, es decir, el reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones de aminoácidos incluyen el reemplazo mediante aminoácidos no naturales o derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Las mutaciones de aminoácidos se pueden generar mediante métodos genéticos o químicos conocidos en el estado de la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir la mutagénesis dirigida al sitio, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que también pueden ser útiles métodos para alterar el grupo de cadena lateral de un aminoácido mediante métodos que no sean la ingeniería genética, tal como modificación química. En la presente se pueden usar diversas designaciones para indicar la misma mutación de aminoácido. Por ejemplo, una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc a glicina se puede indicar como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

El término "anticuerpo" se usa en la presente en su sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales,

anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad de unión al antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv y scFab); anticuerpos de dominio único (dAb); y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. Para obtener una reseña de determinados fragmentos de anticuerpos, ver Holliger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136 (2005).

La expresión "dominio de unión al antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a una parte o la totalidad de un antígeno. Un dominio de unión al antígeno puede ser proporcionado, por ejemplo, por uno o más dominios variables de anticuerpos (también denominados regiones variables de anticuerpos). En particular, un dominio de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) del anticuerpo y un dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo.

Como se usa en la presente, la expresión "molécula de unión al antígeno" se refiere, en su sentido más amplio, a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Algunos ejemplos de moléculas de unión al antígeno son las inmunoglobulinas y sus derivados, por ejemplo, sus fragmentos, así como los receptores de unión al antígeno y sus derivados.

Como se usa en la presente, la expresión "porción de unión al antígeno" se refiere a una molécula de polipéptido que se une específicamente a un determinante antigénico. En una forma de realización, una porción de unión al antígeno es capaz de dirigir la entidad a la que está unida (por ejemplo, una célula que expresa un receptor de unión al antígeno que comprende la porción de unión al antígeno) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que tiene el determinante antigénico. Las porciones de unión al antígeno incluyen anticuerpos y fragmentos de estos como se definen adicionalmente en la presente. Las partes de unión al antígeno particulares incluyen un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo, que comprende una región variable de la cadena pesada de anticuerpo y una región variable de la cadena liviana de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento scFv). En ciertas formas de realización, las porciones de unión al antígeno pueden comprender regiones constantes de anticuerpo como se definen adicionalmente en la presente y se conocen en el estado de la técnica.

Las regiones constantes de la cadena pesada útiles incluyen cualquiera de los cinco isotipos: α , δ , ϵ , γ o μ . Las regiones constantes de la cadena liviana útiles incluyen cualquiera de los dos isotipos: κ y λ .

En el contexto de la presente invención, la expresión "receptor de unión al antígeno" se refiere a una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende al menos una porción de unión al antígeno. Un receptor de unión al antígeno puede estar formado por partes polipeptídicas de diferentes fuentes. En consecuencia, también puede entenderse como una "proteína de fusión" y/o una "proteína quimérica". En general, las proteínas de fusión son proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes (o, preferentemente, ADNc) que originalmente codificaban proteínas separadas. La traducción de este gen de fusión (o ADNc de fusión) da lugar a un único polipéptido, preferentemente con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. Las proteínas de fusión recombinantes se crean artificialmente mediante la tecnología de ADN recombinante para su uso en investigación biológica o terapéutica. A continuación se describen otros detalles de los receptores de unión al antígeno de la presente invención. En el contexto de la presente invención, se entiende que un CAR (receptor de antígeno quimérico) es un receptor de unión al antígeno que comprende una porción extracelular con una porción de unión al antígeno fusionada mediante una secuencia espaciadora a un dominio transmembranario de anclaje que, a su vez, está fusionado a dominios de señalización intracelulares.

Un "sitio de unión al antígeno" se refiere al sitio, es decir, uno o más residuos de aminoácidos, de una molécula de unión al antígeno que proporciona interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo comprende residuos de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Una molécula de inmunoglobulina nativa tiene por lo general dos sitios de unión al antígeno; una molécula Fab tiene por lo general un único sitio de unión al antígeno.

La expresión "dominio de unión al antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo o un receptor de unión al antígeno que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria con una parte o la totalidad de un antígeno. Un dominio de unión al antígeno se puede proporcionar, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables de inmunoglobulina (también denominados regiones variables). En particular, un dominio de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) de inmunoglobulina y un dominio variable de la cadena pesada (VH) de inmunoglobulina.

Como se usa en la presente, la expresión "determinante antigénico" es sinónimo de "antígeno" y "epítipo", y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de

aminoácidos o una configuración conformacional formada por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une una porción de unión al antígeno, y forman un complejo porción de unión al antígeno-antígeno. Los determinantes antigénicos útiles pueden encontrarse, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células enfermas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (ECM). Las proteínas denominadas antígenos en la presente pueden ser cualquier forma natural de las proteínas de cualquier fuente de vertebrado, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. En una modalidad particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína específica en la presente descripción, el término abarca la proteína sin procesar, de "longitud completa", así como también cualquier forma de la proteína que resulta del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes de origen natural de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

"Anticuerpos que comprenden un dominio Fc mutado" de acuerdo con la presente invención, es decir, los anticuerpos terapéuticos pueden tener uno, dos, tres o más dominios de unión y pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o multiespecíficos. Los anticuerpos pueden ser de longitud completa de una sola especie, o pueden estar quimerizados o humanizados. En el caso de un anticuerpo con más de dos dominios de unión al antígeno, algunos dominios de unión pueden ser idénticos y/o tener la misma especificidad.

El término "ATD", como se usa en la presente, se refiere al "dominio transmembranario de anclaje", que define un tramo polipeptídico capaz de integrarse en las membranas celulares de una célula. La ATM puede estar fusionada a dominios polipeptídicos extracelulares y/o intracelulares en donde estos dominios polipeptídicos extracelulares y/o intracelulares estarán confinados a la membrana celular. En el contexto de los receptores de unión al antígeno de la presente invención, la ATM confiere unión a la membrana y confinamiento del receptor de unión al antígeno de la presente invención. Los receptores de unión al antígeno de la presente invención comprenden al menos un ATM y un dominio extracelular que comprende una porción de unión al antígeno. Además, la ATM puede fusionarse a dominios de señalización intracelular.

La expresión "unión específica" se refiere a que la unión es selectiva para el antígeno y puede distinguirse de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un resto de unión a antígeno de unirse a un determinante antigénico específico se puede medir ya sea a través de un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) u otras

técnicas conocidas por una persona del oficio de nivel medio, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En una forma de realización, el grado de unión de una porción de unión al antígeno a una proteína no relacionada es menor de alrededor de 10 % de la unión de la porción de unión al antígeno al antígeno según se mide, por ejemplo, mediante SPR. En ciertas formas de realización, una porción de unión al antígeno que se une al antígeno, o una molécula de unión al antígeno que comprende esa porción de unión al antígeno, tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

El término "CDR" como se emplea en la presente se refiere a "región determinante de la complementariedad", que es bien conocido en el estado de la técnica. Las CDR son partes de inmunoglobulinas o receptores de unión al antígeno que determinan la especificidad de dichas moléculas y entran en contacto con un ligando específico. Las CDR son la parte más variable de la molécula y contribuyen a la diversidad de unión al antígeno de estas moléculas. Hay tres regiones CDR, CDR1, CDR2 y CDR3 en cada dominio V. CDR-H representa una región CDR de una cadena pesada variable y CDR-L se relaciona con una región CDR de una cadena liviana variable. VH significa cadena pesada variable y VL significa cadena liviana variable. Las regiones CDR de una región derivada de Ig pueden determinarse como se describe en "Kabat" (Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.^a edición. publicación NIH N.º 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services (1991); Chothia J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) o "Chothia" (Nature 342 (1989), 877-883).

El término "CD3z" se refiere a la cadena zeta CD3 de glucoproteína de superficie de linfocitos T, también conocida como "cadena zeta T3 de receptor de linfocitos T" y "CD247".

La expresión "receptor de antígeno quimérico" o "receptor quimérico" o "CAR" se refiere a un receptor de unión al antígeno constituido por una porción extracelular de una porción de unión al antígeno (por ejemplo, un dominio de anticuerpo de cadena simple) fusionado mediante una secuencia espaciadora a dominios de señalización/coseñalización intracelular (tal como, por ejemplo, de CD3z y CD28).

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. En ciertos aspectos, el anticuerpo es del

isotipo IgG₁. En algunos aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG₁ con mutación P329G, L234A y L235A para reducir la función efectora de la región Fc. En otros aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG₂. En ciertos aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG₄ con la mutación S228P en la región bisagra para mejorar la estabilidad del anticuerpo IgG₄. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. La cadena liviana de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en función de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Las expresiones "región constante derivada de origen humano" o "región constante humana" como se usa en la presente solicitud indica una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o una región constante de la cadena liviana kappa o lambda. Dichas regiones constantes se pueden usar en anticuerpos humanos o humanizados y se conocen bien en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) (ver además, por ejemplo, Johnson, G., y Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2785-2788). A menos que se especifique de otro modo en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU de Kabat, como se describe en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), publicación NIH 91-3242.

Una molécula Fab "de entrecruzamiento" (también denominada "Crossfab") se refiere a una molécula Fab en donde los dominios variables o los dominios constantes de la cadena pesada y liviana de Fab se intercambian (es decir, se reemplazan entre sí), es decir, la molécula Fab de entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por el dominio variable de la cadena liviana VL y el dominio constante de la cadena pesada 1 CH1 (VL-CH1, en dirección del extremo N al C), y una cadena peptídica compuesta por el dominio variable de la cadena pesada VH y el dominio constante de la cadena liviana CL (VH-CL, en dirección del extremo N al C). Con fines de claridad, en una molécula Fab de entrecruzamiento en donde los dominios variables de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, la cadena peptídica que comprende el dominio constante de la cadena pesada 1 CH1 se denomina en la presente la "cadena pesada" de la molécula Fab de entrecruzamiento.

El término "CSD", como se usa en la presente, se refiere al dominio de señalización coestimulador.

Las "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas que se atribuyen a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de las funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y unión a C1q; unión a receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

Como se usa en la presente, se considera que las expresiones "diseñar, diseñado, diseño por ingeniería genética" incluyen cualquier manipulación de la cadena principal del péptido o las modificaciones posteriores a la traducción de un polipéptido natural o recombinante o un fragmento de este. El diseño por ingeniería genética incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques.

La expresión "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificado que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus o fragmento de ácido nucleico. En general, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se debe transcribir y un promotor. En determinadas modalidades, el casete de expresión de la invención comprende secuencias de polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de estas.

Una "molécula Fab" se refiere a una proteína que consiste en el dominio VH y CH1 de la cadena pesada (la "cadena pesada de Fab") y el dominio VL y CL de la cadena liviana (la "cadena liviana de Fab") de una inmunoglobulina.

La expresión "dominio Fc" o "región Fc" se usa en la presente para definir una región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. Las expresiones incluyen regiones Fc de secuencia nativa y variantes de regiones Fc. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define por lo general para extenderse desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de cadena pesada. Sin embargo, los anticuerpos producidos por las células huésped también se pueden someter a escisión posterior a la traducción de uno o más, particularmente uno o dos, aminoácidos del extremo C de la cadena pesada. Por lo tanto, un anticuerpo producido por una célula huésped mediante la expresión de una molécula

de ácido nucleico específica que codifica la cadena pesada de longitud completa puede incluir la cadena pesada de longitud completa o puede incluir una variante escindida de cadena pesada de longitud completa (también denominada en la presente “cadena pesada variable escindida”). Esto también se puede aplicar cuando los dos aminoácidos del extremo C de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Por lo tanto, la lisina (Lys447) del extremo C, o la glicina (Gly446) y lisina (K447) del extremo C, de la región Fc pueden estar presentes o no. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas que incluyen dominios Fc (o una subunidad de un dominio Fc como se define en la presente) se indican en la presente sin el dipéptido de glicina-lisina del extremo C si no se indica lo contrario. En una forma de realización de la invención, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente, comprende un dipéptido de glicina-lisina del extremo C adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización de la invención, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente, comprende un residuo de glicina del extremo C adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Las composiciones de la invención, tales como las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, comprenden una población de moléculas de unión al antígeno de la invención. La población de moléculas de unión al antígeno puede comprender moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una variante escindida de la cadena pesada. La población de moléculas de unión al antígeno puede consistir en una mezcla de moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una variante escindida de la cadena pesada, en donde al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno tienen una variante escindida de la cadena pesada. En una forma de realización de la invención, una composición que comprende una población de moléculas de unión al antígeno de la invención comprende una molécula de unión al antígeno que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un dipéptido de glicina-lisina del extremo C adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización de la invención, una composición que comprende una población de moléculas de unión al antígeno de la invención comprende una molécula de unión al dominio Fc de activación inmunitaria que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un residuo de glicina del extremo C adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización de la invención, una

composición de este tipo comprende una población de moléculas de unión al antígeno compuesta por moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente; moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un residuo de glicina del extremo C adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un dipéptido glicina-lisina del extremo C adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). A menos que se especifique de otro modo en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (ver también lo anterior). Como se usa en la presente, una "subunidad" de un dominio Fc se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, capaz de autoasociarse de manera estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio Fc de IgG comprende un dominio constante CH2 de IgG y CH3 de IgG.

La "estructura" o "FR" se refiere a los residuos de dominio variable distintos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). El FR de un dominio variable consiste por lo general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, en general las secuencias de CDR y FR aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-CDR-H1(CDR-L1)-FR2- CDR-H2(CDR-L2)-FR3- CDR-H3(CDR-L3)-FR4.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de manera indistinta en la presente para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en la presente.

Por "fusionado" se entiende que los componentes (por ejemplo, un Fab y un dominio transmembranario) están unidos mediante enlaces peptídicos, ya sea directamente o a través de uno o más ligadores peptídicos.

Las expresiones "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera indistinta y se refieren a células en donde se introdujo un ácido nucleico exógeno, incluso la progenie de tales células. Las células huésped

incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de estas, independientemente de la cantidad de pases. La progenie puede no ser idéntica por completo en el contenido de ácido nucleico con respecto a una célula de origen, sino que puede contener mutaciones. En la presente descripción se incluyen progenies mutantes que pueden tener la misma función o actividad biológica que se identifica o selecciona en la célula transformada originalmente.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

Una "estructura de consenso humano" es una estructura que representa los residuos de aminoácidos que ocurren más comúnmente en una selección de secuencias estructurales de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a edición, publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En un aspecto, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En un aspecto, para el VH, el subgrupo es el subgrupo kappa III como en Kabat *et al.*, *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" (por ejemplo, un fragmento scFv humanizado) se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de CDR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanas. En ciertos aspectos, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un, y generalmente dos, dominios variables, en donde todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a aquellas de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a aquellas de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se sometió a humanización.

Como se usa en la presente, la expresión "región hipervariable" o "HVR" se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y que determinan la especificidad de unión al antígeno, por ejemplo, "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR").

Generalmente, los anticuerpos comprenden seis CDR; tres en la VH (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) y tres en la VL (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Las CDR ilustrativas en la presente descripción incluyen:

- (a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));
- (b) CDR en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); y
- (c) contactos con el antígeno en residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)).

A menos que se indique de cualquier otra manera, las CDR se determinan de acuerdo con Kabat y otros, *supra*. Una persona del oficio de nivel medio entenderá que las designaciones de CDR también se pueden determinar de acuerdo con Chothia, *supra*, MacCallum, *supra*, o cualquier otro sistema de nomenclatura aceptado científicamente.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, que incluyen, pero sin limitarse a, un agente citotóxico.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertos aspectos, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es un anticuerpo que se separó de un componente de su entorno natural. En algunos aspectos, un anticuerpo se purifica hasta más de 95 % o 99 % de pureza, según se determina mediante, por ejemplo, métodos electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, HPLC de fase inversa o de intercambio iónico). Para reseñas sobre métodos de evaluación de la pureza del anticuerpo, ver, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

La expresión "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltones compuestas por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas que están unidas mediante un puente disulfuro. Del extremo N al C, cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH), también denominado dominio pesado variable o región variable de la cadena pesada,

seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también denominados región constante de la cadena pesada. De forma similar, del extremo N al C, cada cadena liviana tiene un dominio variable (VL), también denominado dominio liviano variable o región variable de la cadena liviana, seguido de un dominio liviano constante (CL), también denominado región constante de la cadena liviana. La cadena pesada de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de cinco tipos, denominados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales se pueden dividir adicionalmente en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). La cadena liviana de una inmunoglobulina puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en función de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, ligados a través de la región bisagra de inmunoglobulina.

Una molécula de “ácido nucleico aislado” o un polinucleótido se refiere a una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se retiró de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado a los fines de la presente invención. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos (parcialmente o sustancialmente) purificados en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en células que contienen normalmente la molécula de polinucleótido, pero la molécula de polinucleótido está presente de manera extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como formas de cadenas positivas y negativas, y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención también incluyen tales moléculas producidas de manera sintética. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, un sitio de unión al ribosoma o un finalizador de la transcripción.

Un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95 % “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención se refiere a que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica con respecto a la secuencia de referencia excepto por que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se puede eliminar

o sustituir con otro nucleótido, o una cantidad de nucleótidos hasta 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones del terminal 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones del terminal, que se intercalan ya sea individualmente entre los residuos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Prácticamente, si cualquier secuencia de polinucleótidos en particular es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica con respecto a una secuencia de nucleótidos de la presente invención puede determinarse de manera convencional usando programas informáticos conocidos, tales como los analizados más adelante para los polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

Un "polipéptido aislado" o una variante o un derivado de este significa un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel en particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado se puede eliminar de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de manera recombinante expresados en células huésped se consideran aislados a los fines de la invención, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado, ya sea de manera parcial o sustancial, mediante cualquier técnica adecuada.

Una "modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc" es una manipulación de la cadena principal del péptido o las modificaciones posteriores a la traducción de una subunidad del dominio Fc que reduce o evita la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad del dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Como se usa en la presente, una modificación que promueve la asociación incluye particularmente modificaciones separadas a cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desean asociar (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), en donde las modificaciones son complementarias entre sí con el fin de promover la asociación de las dos subunidades del dominio Fc. Por ejemplo, una modificación que promueve la asociación puede alterar la estructura o carga de una o ambas subunidades del dominio Fc para hacer que su asociación sea estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por lo tanto, la (hetero)dimerización se produce entre un polipéptido que comprende la primera subunidad del dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad del dominio Fc, que pueden no ser idénticas en el sentido de que los componentes adicionales fusionados a cada una de las subunidades (por ejemplo, porciones de unión al antígeno) no son iguales. En algunas formas de realización, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación de aminoácido en el dominio Fc,

específicamente una sustitución de aminoácidos. En una forma de realización particular, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación de aminoácido separada, específicamente una sustitución de aminoácido, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por las posibles variantes de anticuerpos, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de un preparado de anticuerpo monoclonal, variantes que generalmente están presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen por lo general diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por método alguno en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse a partir de diversas técnicas, que incluyen, entre otros, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de expresión en fago y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los sitios de inmunoglobulina humana. Tales métodos y otros métodos de ejemplo para la elaboración de anticuerpos monoclonales se describen en la presente.

Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con una porción heteróloga (por ejemplo, una porción citotóxica) o radioetiqueta. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una composición farmacéutica.

Los "anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con diversas estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltones, compuestas por dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas mediante un puente disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH), también denominado dominio pesado variable o región variable de la cadena pesada, seguido por tres dominios pesados constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, desde el extremo N al C, cada cadena liviana tiene un dominio variable (VL), también denominado dominio liviano variable o región variable de la cadena liviana, seguido por un dominio liviano constante (CL).

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, de ser necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y de no tener en cuenta ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia a los fines de la alineación. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras conocidas por las personas del oficio de nivel medio, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible para el público, tal como el software BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) o el paquete de programas FASTA. Las personas del oficio de nivel medio pueden determinar parámetros adecuados para alinear secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Alternativamente, los valores de porcentaje de identidad se pueden generar mediante el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se presentó con documentación del usuario en la Oficina del Derecho de Autor de los Estados Unidos de América, Washington D.C., 20559, en donde se registró con el N.º de registro de derechos de autor de los Estados Unidos de América TXU510087 y se describe en WO 2001/007611.

A menos que se indique lo contrario, a los fines de la presente, se generan valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos mediante el programa ggsearch del paquete FASTA, versión 36.3.8c o posterior, con una matriz de comparación BLOSUM50. El paquete de programas FASTA fue creado por W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227- 258; y Pearson *et. al.* (1997) Genomics 46:24-36 y está disponible al público en www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml o <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta>. De manera alternativa, se puede usar un servidor público al que se puede acceder en [fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi](http://www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi) para comparar las secuencias, usando el programa ggsearch (global protein:protein) y las opciones por defecto (BLOSUM50; open: -10; ext: -2; Ktup = 2) para garantizar que se realice una alineación global más que local. El porcentaje de identidad de aminoácidos se indica en el encabezado de alineación de salida. La expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a la secuencia de bases que comprende bases de purina y pirimidina

y que está compuesta por polinucleótidos, por lo que dichas bases representan la estructura primaria de una molécula de ácido nucleico. En la presente, la expresión molécula de ácido nucleico incluye el ADN, el ADNc, el ADN genómico, el ARN, las formas sintéticas de ADN y los polímeros mixtos que comprenden dos o más de estas moléculas. Además, la expresión molécula de ácido nucleico incluye tanto las cadenas sentido como antisentido. Asimismo, la molécula de ácido nucleico descrita en la presente puede contener bases de nucleótidos no naturales o derivadas, como podrán apreciar fácilmente las personas del oficio de nivel medio.

El término "prospecto" se refiere a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, el uso, dosis, administración, tratamiento conjunto, contraindicaciones y/o advertencias de uso de dichos productos terapéuticos.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a un preparado que se encuentra en una forma tal para permitir que la actividad biológica del ingrediente activo contenido en su interior sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Una composición farmacéutica suele comprender uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un amortiguador, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en la presente, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) enlazados de manera lineal por enlaces amida (también denominados enlaces peptídicos).

El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término usado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de cualquiera de estos términos, o de manera intercambiable con estos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluso, entre otras, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido puede derivarse de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, pero no se traduce

necesariamente a partir de una secuencia de ácidos nucleicos designada. Puede generarse de cualquier manera, incluso mediante síntesis química. Un polipéptido de la invención puede tener un tamaño de alrededor de 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más o 2.000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, pero no tienen necesariamente tal estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida y pueden adoptar en su lugar una gran cantidad de conformaciones diferentes se denominan desplegados.

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada o un constructo, por ejemplo, ARN mensajero (mARN), ARN derivado de virus o ADN de plásmido (pADN). Un polinucleótido puede comprender un enlace de fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace de amina, tal como el que se encuentra en ácidos nucleicos peptídicos (PNA). La expresión molécula de ácido nucleico se refiere a cualquiera de uno o más de los segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

"Unión reducida", por ejemplo, unión reducida a un receptor Fc, se refiere a una disminución en la afinidad a la interacción respectiva, según se mide, por ejemplo, mediante SPR. Con fines de claridad, el término también incluye la reducción de la afinidad a cero (o por debajo del límite de detección del método analítico), es decir, supresión completa de la interacción. Por el contrario, "unión aumentada" se refiere a un aumento en la afinidad de unión a la interacción respectiva.

La expresión "secuencia reguladora" se refiere a las secuencias de ADN que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere según el organismo huésped. En los procariotas, las secuencias de control suelen incluir el promotor, el sitio de unión al ribosoma y los terminadores. En los eucariotas, las secuencias de control en general incluyen promotores, terminadores y, en algunos casos, potenciadores, transactivadores o factores de transcripción. La expresión "secuencia de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes ventajosos adicionales.

Como se usa en la presente, el término "monocatenario" se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácidos ligados de manera lineal mediante enlaces peptídicos. En determinadas formas de realización, una de las porciones de unión al antígeno es una molécula Fab monocatenaria, es decir, una molécula Fab en donde la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab están conectadas mediante un ligador

peptídico para formar una cadena peptídica única. En una forma de realización de este tipo particular, el extremo C de la cadena liviana de Fab está conectado al extremo N de la cadena pesada de Fab en la molécula Fab monocatenaria. En una forma de realización preferida, la porción de unión al antígeno es un fragmento scFv.

El término "SSD", como se usa en la presente, se refiere "al dominio de señalización estimulador".

Como se usa en la presente, "tratamiento" (y variaciones gramaticales de este tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica para alterar la evolución natural de una enfermedad en el individuo que se trata y se puede realizar ya sea a modo de profilaxis o durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, entre otros, la prevención de la aparición o reaparición de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o prognosis mejorada. En algunos aspectos, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o ralentizar la progresión de una enfermedad.

Como se usa en la presente, "activación de linfocitos T" se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico, seleccionada de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. Las moléculas de unión al dominio Fc de activación inmunitaria de la invención son capaces de inducir la activación de linfocitos T. Los ensayos adecuados para medir la activación de linfocitos T se conocen en el estado de la técnica y se describen en la presente.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad que es eficaz, en dosis y por períodos necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene efectos adversos de una enfermedad.

El término "valente", como se usa en la presente, indica la presencia de una cantidad especificada de sitios de unión al antígeno en una molécula de unión al antígeno. Como tal, la expresión "unión monovalente a un antígeno" indica la presencia de un (y no más de un) sitio de unión al antígeno específico para el antígeno en la molécula de unión al antígeno.

Las expresiones "región variable" o "dominio variable" se refieren al dominio de la cadena

pesada o liviana de un anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural generalmente tienen estructuras similares, en donde cada dominio comprende cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). (Ver, por ejemplo, Kindt y otros, *Kuby Immunology*, 6.^a ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007).) Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Asimismo, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para tamizar una genoteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Ver, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está ligado. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico de autorreplicación así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en donde se introdujo. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que se unen operativamente. En la presente, tales vectores se denominan "vectores de expresión".

Receptores de unión al antígeno capaces de unirse específicamente a un dominio Fc mutado

La presente invención se refiere a receptores de unión al antígeno capaces de unirse específicamente al dominio Fc mutado de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico dirigido a una célula cancerosa. En un aspecto preferido, la presente invención se refiere a receptores de unión al antígeno capaces de unirse específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU. Los receptores de unión al antígeno de la presente invención comprenden un dominio extracelular que comprende al menos una porción de unión al antígeno capaz de unirse específicamente al dominio Fc mutado, pero que no es capaz de unirse específicamente al dominio Fc de origen no mutado. En formas de realización preferidas, la porción de unión al antígeno del receptor de unión al antígeno es una porción de unión al antígeno humanizada o humana, por ejemplo, un scFv humanizado o humano. En una forma de realización preferida, la mutación de aminoácido es P329G y la unión específica a un dominio Fc mutado que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU se mide mediante SPR a 25 °C.

La presente invención se refiere además a la transducción de linfocitos T, tales como linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD3+, linfocitos T $\gamma\delta$ o linfocitos T *natural*

killer (NK), preferentemente linfocitos T CD8+, con un receptor de unión al antígeno como se describe en la presente y su reclutamiento dirigido, por ejemplo, a un tumor, mediante una molécula de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico, que comprende un dominio Fc mutado (por ejemplo, un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU). En una forma de realización, el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un antígeno específico del tumor que se encuentra de forma natural en la superficie de una célula tumoral.

Como se muestra en los ejemplos adjuntos, como prueba de concepto, se construyó el receptor de unión al antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular humanizado de acuerdo con la invención (SEQ ID NO:7 según fue codificada por la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO:20) que es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo terapéutico (representado por el anticuerpo anti-CD20 que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 102 y una cadena liviana de SEQ ID NO:103) que comprende la mutación P329G. Los linfocitos T transducidos (linfocitos T NFAT Jurkat) que expresan la proteína de fusión VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO:7 según fue codificada por la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO:20) pudieron activarse fuertemente mediante la coincubación con el anticuerpo anti-CD20 que comprende la mutación P329G en el dominio Fc junto con células tumorales positivas para CD20.

El tratamiento de células tumorales mediante la combinación de un anticuerpo dirigido contra un antígeno tumoral en donde el anticuerpo comprende la mutación P329G junto con linfocitos T transducidos que expresan la proteína de fusión VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO: 7 según fue codificada por la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO:20) conduce sorprendentemente a una activación más fuerte de los linfocitos T transducidos en comparación con los linfocitos T transducidos que expresan VL1VH3-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO:31 según fue codificada por la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO:33).

Como prueba adicional del concepto se construyeron los receptores de unión al antígeno de acuerdo con la invención (SEQ ID NO:129 y 132, respectivamente) y según se codifica mediante la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO:130 y 133, respectivamente). La expresión y la función de los receptores de unión al antígeno se mostraron en las líneas de linfocitos T y los linfocitos T de donantes humanos. Ambos receptores comprenden la porción de unión al antígeno humanizado en la conformación de VHVL (es decir, VH3VL1) de acuerdo con la invención.

En la proteína de fusión VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD, el dominio VH (VH3) se fusiona en su extremo C al extremo N del dominio VL (VL1) a través de un ligador

peptídico para formar un scFv. El scFv está fusionado en su extremo C (el extremo C del dominio VL) a través de un ligador peptídico al dominio transmembranario de anclaje (ATD). Por otro lado, la proteína de fusión VL1VH3-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD, el dominio VL (VL1) se fusiona en su extremo C al extremo N del dominio VH (VH3) a través de un ligador peptídico para formar un scFv. El scFv está fusionado en su extremo C (el extremo C del dominio VH) a través de un ligador peptídico al dominio transmembranario de anclaje (ATD). Sin limitarse a la teoría, la observación de que la proteína de fusión VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD conduce a una activación más fuerte del linfocito T transducido en comparación con VL1VH3-CD28ATD-CD137CSD-CD3zSSD sugiere que la fusión del dominio VL al dominio de anclaje (a través de un ligador peptídico) conduce a un receptor de unión al antígeno más potente. Esto es inesperado y sorprendente.

La combinación del dominio VH VH3 con el dominio VL VL1, ambos identificados por los presentes inventores, es especialmente favorable, ya que estos dominios variables son dominios de anticuerpo humanizado. Sin limitarse a la teoría, los dominios de anticuerpo humanizado son preferibles, ya que se pueden esperar menos efectos secundarios cuando se aplican porciones de unión al antígeno que comprenden dichos dominios de anticuerpo humanizado a pacientes humanos (como, por ejemplo, menor formación de anticuerpos antifármaco (ADA)). Sin embargo, la humanización puede dar lugar a la pérdida de unión de una porción de unión al antígeno (por ejemplo, una derivada de una fuente no humana). Como se muestra en los ejemplos adjuntos, los dominios VH3 y VL1 humanizados conservan la unión a un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU. Este resultado es inesperado, como lo demuestra, por ejemplo, el hecho de que otros dominios VH y VL humanizados no conserven una unión comparable con un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la presente invención, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende una porción de unión al antígeno humanizada capaz de unirse específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU. El concepto de la presente invención y sus componentes (receptor de unión al antígeno humanizado y anticuerpo terapéutico) se describen con mayor detalle a continuación.

De acuerdo con la presente invención, el emparejamiento de un anticuerpo específico para tumores, es decir, un anticuerpo terapéutico, que comprende un dominio Fc mutado (por ejemplo, que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU, con linfocitos T transducidos con un receptor de unión al antígeno que

comprende/consiste en un dominio extracelular que comprende una porción de unión al antígeno capaz de unirse específicamente al dominio Fc mutado, da como resultado una activación específica de los linfocitos T y la posterior lisis de la célula tumoral. Este enfoque presenta ventajas de seguridad significativas con respecto a los enfoques convencionales basados en linfocitos T, ya que el linfocito T sería inerte en ausencia del anticuerpo que comprende el dominio Fc mutado. En consecuencia, la invención proporciona una plataforma terapéutica versátil en donde se usan anticuerpos de tipo IgG para marcar o etiquetar células tumorales como guía para los linfocitos T y en donde los linfocitos T transducidos se dirigen específicamente hacia las células tumorales proporcionando especificidad para un dominio Fc mutado del anticuerpo de tipo IgG. Después de unirse al dominio Fc mutado del anticuerpo en la superficie de una célula tumoral, el linfocito T transducido, como se describe en la presente, se activa y la célula tumoral será posteriormente lisada. La plataforma es flexible y específica al permitir el uso de diversos anticuerpos diana (existentes o recientemente desarrollados) o la coaplicación de múltiples anticuerpos con diferente especificidad de antígeno, pero que comprenden la misma mutación en el dominio Fc (tal como, por ejemplo, la mutación P329G). El grado de activación de los linfocitos T puede ajustarse adicionalmente mediante el ajuste de la dosis del anticuerpo terapéutico coaplicado o mediante el cambio a diferentes especificidades o formatos de anticuerpo. Los linfocitos T transducidos de acuerdo con la invención son inertes sin la coaplicación de un anticuerpo diana que comprende un dominio Fc mutado porque las mutaciones del dominio Fc como se describe en la presente no se producen en inmunoglobulinas naturales o no mutadas. En consecuencia, en una forma de realización, el dominio Fc mutado no se produce de forma natural en las inmunoglobulinas (humanas).

En consecuencia, la presente invención se refiere a un receptor de unión al antígeno que comprende un dominio extracelular que comprende al menos una porción de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado, en donde la al menos una porción de unión al antígeno no es capaz de unirse específicamente al dominio Fc no mutado. Puede ser particularmente deseable usar anticuerpos terapéuticos con una función efectora reducida en tratamientos contra el cáncer, ya que la función efectora puede conducir a efectos secundarios graves de los tratamientos tumorales a base de anticuerpos, como se describe adicionalmente en la presente.

En el contexto de la presente invención, el receptor de unión al antígeno comprende un dominio extracelular que no se encuentra naturalmente en los linfocitos T o sobre estos. Así, el receptor de unión al antígeno es capaz de proporcionar una especificidad de unión ajustada a las células que expresan el receptor de unión al antígeno de acuerdo con la

invención. Las células, por ejemplo, los linfocitos T, transducidas con (un) receptor(es) de unión al antígeno de la invención se vuelven capaces de unirse específicamente a un dominio Fc mutado, pero no al dominio Fc de origen no mutado. La especificidad la proporciona la porción de unión al antígeno del dominio extracelular del receptor de unión al antígeno. En el contexto de la presente invención y como se explica en la presente, la porción de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado se une a/interactúa con el dominio Fc mutado, pero no con el dominio Fc de origen no mutado.

Porciones de unión al antígeno

En una forma de realización ilustrativa de la presente invención, como prueba de concepto, se proporcionan receptores de unión al antígeno humanizado capaces de unirse específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación de aminoácido P329G y células efectoras que expresan dichos receptores de unión al antígeno. La mutación P329G reduce la unión a los receptores Fc γ y la función efectora asociada. En consecuencia, el dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G se une a los receptores Fc γ con afinidad reducida o eliminada en comparación con el dominio Fc no mutado.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno es capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de forma estable. En una forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG, específicamente una IgG₁ o IgG₄. En una forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En una forma de realización, el dominio Fc mutado presenta una afinidad de unión reducida a un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa. En una forma de realización, el dominio Fc comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora.

En una forma de realización preferida, el dominio Fc mutado comprende la mutación P329G. En consecuencia, el dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G se une a los receptores Fc γ con afinidad reducida o eliminada en comparación con el dominio Fc no mutado.

En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno comprende un dominio extracelular que comprende una porción de unión al antígeno. En una forma de realización, la porción de unión al antígeno es capaz de unirse específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende al menos uno de:

- (a) una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR H) 1 de RYWMN (SEQ ID NO: 1);
- (b) una secuencia de aminoácidos CDR H2 de EITPDSSTINYAPSLKG (SEQ ID NO: 2) o de EITPDSSTINYTPSLKG (SEQ ID NO: 40); y
- (c) una secuencia de aminoácidos CDR H3 de PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3).

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende al menos uno de:

- (d) una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana (CDR L)1 de RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4);
- (e) una secuencia de aminoácidos CDR L2 de GTNKRAP (SEQ ID NO: 5); y
- (f) una secuencia de aminoácidos CDR L3 de ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

En una forma de realización preferida, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR H) 1 de RYWMN (SEQ ID NO: 1);
- (b) una secuencia de aminoácidos CDR H2 de EITPDSSTINYAPSLKG (SEQ ID NO: 2) o de EITPDSSTINYTPSLKG (SEQ ID NO: 40);
- (c) una secuencia de aminoácidos CDR H3 de PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3);

y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende:

- (d) una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana (CDR L)1 de RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4);
- (e) una secuencia de aminoácidos CDR L2 de GTNKRAP (SEQ ID NO: 5); y
- (f) una secuencia de aminoácidos CDR L3 de ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

En una forma de realización particular, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR H) 1 de RYWMN (SEQ ID NO: 1);
- (b) una secuencia de aminoácidos CDR H2 de EITPDSSTINYAPSLKG (SEQ ID NO: 2);
- (c) una secuencia de aminoácidos CDR H3 de PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3);

y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende:

- (d) una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana (CDR L)1 de RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4);
- (e) una secuencia de aminoácidos CDR L2 de GTNKRAP (SEQ ID NO: 5); y

(f) una secuencia de aminoácidos CDR L3 de ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

En otra forma de realización particular, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR H) 1 de RYWMN (SEQ ID NO: 1);

(b) una secuencia de aminoácidos CDR H2 de EITPDSSTINYTPSLKG (SEQ ID NO: 40);

(c) una secuencia de aminoácidos CDR H3 de PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3);

y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende:

(d) una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana (CDR L)1 de RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4);

(e) una secuencia de aminoácidos CDR L2 de GTNKRAP (SEQ ID NO: 5); y

(f) una secuencia de aminoácidos CDR L3 de ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:44.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:126.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es

al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:127.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44 y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

En otra forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:126 y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:127.

En una forma de realización preferida, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 8, y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

En otra forma de realización preferida, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:126, y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:127.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno es un scFv o un scFab. En una forma de realización preferida, la porción de unión al antígeno es un scFv.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena liviana (VL), en donde el dominio VH está conectado al dominio VL, en particular a través de un ligador peptídico. En una forma de realización, el extremo C del dominio VL está conectado al extremo N del dominio VH, en particular a través de un ligador peptídico. En una forma de realización preferida, el extremo C del dominio VH está conectado al extremo N del dominio VL, en particular a través de un ligador peptídico. En una forma de realización, el ligador peptídico comprende la secuencia de aminoácidos GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 16).

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno es un scFv, que es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH), un dominio variable de la cadena liviana (VL) y un ligador, en donde dichos dominios variables y dicho ligador tienen una de las siguientes configuraciones en dirección del extremo N al extremo C: a) VH-ligador-VL o b) VL-ligador-VH. En una forma de realización preferida, el scFv tiene la configuración VH-ligador-VL.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:122 y SEQ ID NO:124.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:122. En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 122.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:124. En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124.

Las moléculas de unión al antígeno que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena liviana (VL), tales como los fragmentos scFv y scFab descritos en la presente, pueden estabilizarse adicionalmente introduciendo puentes disulfuro entre los dominios VH y VL. En consecuencia, en una forma de realización, los fragmentos scFv y/o los fragmentos scFab comprendidos en los receptores de unión al antígeno de acuerdo con la invención se estabilizan adicionalmente mediante la generación de enlaces disulfuro entre cadenas a través de la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, la posición 44 en la cadena pesada variable y la posición 100 en la cadena liviana variable de acuerdo con la numeración de Kabat). En una forma de realización, se proporciona una de las secuencias VH y/o VL anteriormente proporcionadas que comprende al menos una sustitución de un aminoácido por cisteína (en particular en la posición 44 de la cadena pesada variable y/o en la posición 100 de la cadena liviana variable de acuerdo con la numeración de Kabat). En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:128. En una forma de realización, la porción de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128.

Dominio transmembranario de anclaje (ATD)

En el contexto de la presente invención, el dominio transmembranario de anclaje de los receptores de unión al antígeno de la presente invención puede caracterizarse por no tener un sitio de escisión para proteasas de mamíferos. En el contexto de la presente invención, las proteasas se refieren a enzimas proteolíticas que son capaces de hidrolizar la secuencia de aminoácidos de un dominio transmembranario que comprende un sitio de corte para la proteasa. El término proteasas incluye tanto las endopeptidasas como las exopeptidasas. En el contexto de la presente invención se puede usar cualquier dominio transmembranario de anclaje de una proteína transmembranaria según lo establecido, entre otros, por la nomenclatura CD para generar los receptores de unión al antígeno de la invención.

En consecuencia, en el contexto de la presente invención, el dominio transmembranario de anclaje puede comprender parte de un dominio transmembranario murino/de ratón o, preferentemente, de un dominio transmembranario humano. Un ejemplo de dicho dominio transmembranario de anclaje es un dominio transmembranario de CD8, por ejemplo, que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la presente en SEQ ID NO: 11 (según fue codificada por la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO: 24). En el contexto de la presente invención, el dominio transmembranario de anclaje del receptor de unión al antígeno de la presente invención puede comprender/consistir en una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 11 (según fue codificada por la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO: 24).

En otra forma de realización, el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente puede comprender el dominio transmembranario de CD28 que está ubicado en los aminoácidos 153 a 179, 154 a 179, 155 a 179, 156 a 179, 157 a 179, 158 a 179, 159 a 179, 160 a 179, 161 a 179, 162 a 179, 163 a 179, 164 a 179, 165 a 179, 166 a 179, 167 a 179, 168 a 179, 169 a 179, 170 a 179, 171 a 179, 172 a 179, 173 a 179, 174 a 179, 175 a 179, 176 a 179, 177 a 179 o 178 a 179 de la proteína CD28 humana de longitud completa que se muestra en SEQ ID NO: 61 (según fue codificada por el ADNc que se muestra en SEQ ID NO: 70).

De manera alternativa, cualquier proteína que tenga un dominio transmembranario, según lo previsto, entre otros, por la nomenclatura CD, puede usarse como dominio transmembranario de anclaje de la proteína receptora de unión al antígeno de la invención.

En algunas formas de realización, el dominio transmembranario de anclaje comprende el dominio transmembranario de cualquiera del grupo que consiste en CD27 (SEQ ID NO: 59, según fue codificada por SEQ ID NO: 58), CD137 (SEQ ID NO: 67, según fue codificada por SEQ ID NO: 66), OX40 (SEQ ID NO: 71, según fue codificada por SEQ ID NO: 70), ICOS (SEQ ID NO: 75, según fue codificada por SEQ ID NO: 74), DAP10 (SEQ ID NO: 80, según fue codificada por SEQ ID NO: 79), DAP12 (SEQ ID NO: 83, según fue codificada por SEQ ID NO: 82), CD3z (SEQ ID NO: 88, según fue codificada por SEQ ID NO: 87), FCGR3A (SEQ ID NO: 90, según fue codificada por SEQ ID NO: 91), NKG2D (SEQ ID NO: 94, según fue codificada por SEQ ID NO: 95), CD8 (SEQ ID NO: 119, según fue codificada por SEQ ID NO: 120) o un fragmento de la transmembrana de estos que conserve la capacidad de anclar el receptor de unión al antígeno a la membrana.

Las secuencias humanas podrían ser beneficiosas en el contexto de la invención común, por ejemplo, porque (partes) del dominio transmembranario de anclaje podrían ser accesibles desde el espacio extracelular y, por lo tanto, al sistema inmunitario de un

paciente. En una forma de realización preferida, el dominio transmembranario de anclaje comprende una secuencia humana. En tales formas de realización, el dominio transmembranario de anclaje comprende el dominio transmembranario de cualquiera del grupo que consiste en CD27 humano (SEQ ID NO: 57, según fue codificada por SEQ ID NO: 56), CD137 humano (SEQ ID NO: 65, según fue codificada por SEQ ID NO: 64), OX40 humano (SEQ ID NO: 69, según fue codificada por SEQ ID NO: 68), ICOS humano (SEQ ID NO: 73, según fue codificada por SEQ ID NO: 72), DAP10 humana (SEQ ID NO: 78, según fue codificada por SEQ ID NO: 77), DAP12 humana (SEQ ID NO: 81, según fue codificada por SEQ ID NO: 80), CD3z humano (SEQ ID NO: 86, según fue codificada por SEQ ID NO: 85), FCGR3A humano (SEQ ID NO: 88, según fue codificada por SEQ ID NO: 89), NKG2D humano (SEQ ID NO: 92, según fue codificada por SEQ ID NO: 93), CD8 humano (SEQ ID NO: 117, según fue codificada por SEQ ID NO: 118) o un fragmento de la transmembrana de estos que conserve la capacidad de anclar el receptor de unión al antígeno a la membrana.

Dominio de señalización estimulador (SSD) y dominio de señalización coestimulador (CSD)

Preferentemente, el receptor de unión al antígeno de la presente invención comprende al menos un dominio de señalización estimulador y/o al menos un dominio de señalización coestimulador. En consecuencia, el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende preferentemente un dominio de señalización estimulador, que proporciona la activación de linfocitos T. El receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente puede comprender un dominio de señalización estimulador que es una parte de fragmento/polipéptido de CD3z murino/de ratón o humano (la Entrada UniProt del CD3z humano es P20963 (número de versión 177 con número de secuencia 2; la entrada UniProt del CD3z murino/de ratón es P24161 (número de acceso citable primario) o Q9D3G3 (número de acceso citable secundario) con el número de versión 143 y el número de secuencia 1)), Fcgr3A (la entrada UniProt del FCGR3A humano es P08637 (número de versión 178 con número de secuencia 2)), o NKG2D (la entrada UniProt del NKG2D humano es P26718 (número de versión 151 con número de secuencia 1); la entrada UniProt del NKG2D murino/de ratón es O54709 (número de versión 132 con número de secuencia 2)).

Por lo tanto, el dominio de señalización estimulador que está comprendido en el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente puede ser una parte de fragmento/polipéptido de la longitud completa de CD3z, Fcgr3A o NKG2D. Las secuencias de aminoácidos de la longitud completa de CD3z o NKG2D murino/de ratón

se muestran en la presente como SEQ ID NO: 86 (CD3z), 90 (Fcgr3A) o 94 (NKG2D) (murina/de ratón según fue codificada por las secuencias de ADN que se muestran en SEQ ID NO:87 (CD3z), 91 (FCGR3A) o 95 (NKG2D). Las secuencias de aminoácidos de CD3z, Fcgr3A o NKG2D de longitud completa humanos se muestran en la presente como SEQ ID NO:84 (CD3z), 88 (FCGR3A) o 92 (NKG2D) (humana según fue codificada por las secuencias de ADN que se muestran en SEQ ID NO:85 (CD3z), 89 (FCGR3A) o 93 (NKG2D)). El receptor de unión al antígeno de la presente invención puede comprender fragmentos de CD3z, Fcgr3A o NKG2D como dominio estimulador, siempre que se incluya al menos un dominio de señalización. En particular, cualquier parte/fragmento de CD3z, Fcgr3A, o NKG2D es adecuado como dominio estimulador siempre y cuando se incluya al menos un motivo de señalización. Sin embargo, más preferentemente, el receptor de unión al antígeno de la presente invención comprende polipéptidos que se derivan de origen humano. De este modo, más preferentemente, el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende las secuencias de aminoácidos que se muestran en la presente como SEQ ID NO: 84 (CD3z), 88 (FCGR3A) o 92 (NKG2D) (humana según fue codificada por las secuencias de ADN que se muestran en SEQ ID NO: 85 (CD3z), 89 (FCGR3A) o 93 (NKG2D)). En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno de la presente invención puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 (según fue codificada por la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO: 26). En otras formas de realización, el receptor de unión al antígeno comprende la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 13 o una secuencia que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 sustituciones, eliminaciones o inserciones en comparación con SEQ ID NO: 13 y que se caracteriza por tener una actividad de señalización estimuladora. Las configuraciones específicas de los receptores de unión al antígeno que comprenden un dominio de señalización estimulador (SSD) se proporcionan a continuación y en los ejemplos y las figuras. La actividad de señalización estimuladora puede determinarse, por ejemplo, mediante el aumento de la liberación de citocinas, medido mediante ELISA (IL-2, IFN γ , TNF α), el aumento de la actividad proliferativa (medido mediante el aumento de la cantidad de células) o el aumento de la actividad lítica, medido mediante ensayos de liberación de LDH.

Además, el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende preferentemente al menos un dominio de señalización coestimulador que proporciona actividad adicional al linfocito T. El receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente puede comprender un dominio de señalización coestimulador que es una parte de fragmento/polipéptido de CD28 murino/de ratón o humano (la Entrada UniProt de

CD28 humano es P10747 (número de versión 173 con número de secuencia 1); la entrada UniProt de CD28 murino/de ratón es P31041 (número de versión 134 con número de secuencia 2)), CD137 (la entrada UniProt de CD137 humano es Q07011 (número de versión 145 con número de secuencia 1); la entrada UniProt de CD137 murino/de ratón es P20334 (número de versión 139 con número de secuencia 1)), OX40 (la entrada UniProt de OX40 humano es P23510 (número de versión 138 con número de secuencia 1); la entrada UniProt de OX40 murino/de ratón es P43488 (número de versión 119 con número de secuencia 1)), ICOS (la entrada UniProt de ICOS humano es Q9Y6W8 (número de versión 126 con número de secuencia 1)); la entrada UniProt de ICOS murino/de ratón es Q9WV40 (número de acceso citable primario) o Q9JL17 (número de acceso citable secundario) con el número de versión 102 y la versión de secuencia 2)), CD27 (la entrada UniProt de CD27 humano es P26842 (número de versión 160 con número de secuencia 2); la entrada UniProt de CD27 murino/de ratón es P41272 (número de versión 137 con versión de secuencia 1)), 4-1-BB (la entrada UniProt de 4-1-BB murino/de ratón es P20334 (número de versión 140 con versión de secuencia 1); la entrada UniProt de 4-1-BB humano es Q07011 (número de versión 146 con versión de secuencia)), DAP10 (la entrada UniProt de DAP10 humana es Q9UBJ5 (número de versión 25 con número de secuencia 1); la entrada UniProt de DAP10 murina/de ratón es Q9QUJ0 (número de acceso citable primario) o Q9R1E7 (número de acceso citable secundario) con el número de versión 101 y el número de secuencia 1)) o DAP12 (la entrada UniProt de DAP12 humana es O43914 (número de versión 146 y el número de secuencia 1); la entrada UniProt de DAP12 murina/de ratón es O054885 (número de acceso citable primario) o Q9R1E7 (número de acceso citable secundario) con el número de versión 123 y el número de secuencia 1). En algunas formas de realización de la presente invención, el receptor de unión al antígeno de la presente invención puede comprender uno o más, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los dominios de señalización coestimuladores definidos en la presente. En consecuencia, en el contexto de la presente invención, el receptor de unión al antígeno de la presente invención puede comprender una parte de fragmento/polipéptido de un CD137 murino/de ratón o, preferentemente, humano, como primer dominio de señalización coestimulador, y el segundo dominio de señalización coestimulador se selecciona del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 y DAP12 murinos/de ratón o, preferentemente, humanos, o fragmentos de estos. Preferentemente, el receptor de unión al antígeno de la presente invención comprende un dominio de señalización coestimulador que se deriva de un origen humano. De este modo, más preferentemente, los dominios de señalización coestimuladores que están comprendidos en el receptor de unión al antígeno de la

presente invención pueden comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 12 (según fue codificada por la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO: 25).

De este modo, el dominio de señalización coestimulador que puede estar opcionalmente comprendido en el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente es una parte de fragmento/polipéptido de CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 o DAP12 de longitud completa. Las secuencias de aminoácidos de CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, CD27, DAP10 y DAP12 de longitud completa murinos/de ratón se muestran en la presente como SEQ ID NO: 59 (CD27), 63 (CD28), 67 (CD137), 71 (OX40), 75 (ICOS), 79 (DAP10) u 83 (DAP12) (murina/de ratón según fue codificada por las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 58 (CD27), 62 (CD28), 66 (CD137), 70 (OX40), 74 (ICOS), 78 (DAP10) u 82 (DAP12)). Sin embargo, dado que las secuencias humanas son las más preferidas en el contexto de la presente invención, el dominio de señalización coestimulador que puede estar opcionalmente comprendido en la proteína receptora de unión al antígeno proporcionada en la presente es una parte de fragmento/polipéptido de CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 o DAP12 humanos de longitud completa. Las secuencias de aminoácidos de CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 o DAP12 de longitud completa humanos se muestran en la presente como SEQ ID NO: 57 (CD27), 61 (CD28), 65 (CD137), 69 (OX40), 73 (ICOS), 77 (DAP10) u 81 (DAP12) (humana según fue codificada por las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 56 (CD27), 60 (CD28), 64 (CD137), 68 (OX40), 72 (ICOS), 76 (DAP10) u 80 (DAP12)).

En una forma de realización preferida, el receptor de unión al antígeno comprende CD28 o un fragmento de este como dominio de señalización coestimulador. El receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente puede comprender un fragmento de CD28 como dominio de señalización coestimulador, siempre que esté comprendido al menos un dominio de señalización de CD28. En particular, cualquier parte/fragmento de CD28 es adecuado para el receptor de unión al antígeno de la invención siempre que esté comprendido al menos uno de los motivos de señalización de CD28. Los dominios de señalización coestimuladores PYAP (AA 208 a 211 de CD28) e YMNM (AA 191 a 194 de CD28) son beneficiosos para la función del polipéptido CD28 y los efectos funcionales enumerados anteriormente. La secuencia de aminoácidos del dominio YMNM se muestra en SEQ ID NO: 96; la secuencia de aminoácidos del dominio PYAP se muestra en SEQ ID NO: 97. En consecuencia, en el receptor de unión al antígeno de la presente invención, el polipéptido CD28 comprende preferentemente una secuencia derivada del dominio intracelular de un polipéptido CD28 que tiene las secuencias YMNM (SEQ ID NO: 96) y/o PYAP (SEQ ID NO: 97). En otras formas de realización, en el receptor de

unión al antígeno de la presente invención, uno o ambos de estos dominios están mutados a FMNM (SEQ ID NO: 98) y/o AYAA (SEQ ID NO: 99), respectivamente. Cualquiera de estas mutaciones reduce la capacidad de una célula transducida que comprende el receptor de unión al antígeno para liberar citocinas sin afectar su capacidad de proliferación y puede usarse ventajosamente para prolongar la viabilidad y, por lo tanto, el potencial terapéutico de las células transducidas. O, en otras palabras, dicha mutación no funcional aumenta preferentemente la persistencia de las células que se transducen con el receptor de unión al antígeno *in vivo* proporcionado en la presente. Sin embargo, estos motivos de señalización pueden estar presentes en cualquier sitio dentro del dominio intracelular del receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente.

En otra forma de realización preferida, el receptor de unión al antígeno comprende CD137 o un fragmento de este como dominio de señalización coestimulador. El receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente puede comprender un fragmento de CD137 como dominio de señalización coestimulador, siempre que esté comprendido al menos un dominio de señalización de CD137. En particular, cualquier parte/fragmento de CD137 es adecuado para el receptor de unión al antígeno de la invención siempre que esté comprendido al menos uno de los motivos de señalización de CD137. En una forma de realización preferida, el polipéptido CD137 que está comprendido en la proteína receptora de unión al antígeno de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 (según fue codificada por la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO: 25).

Las configuraciones específicas de los receptores de unión al antígeno que comprenden un dominio de señalización coestimulador (CSD) se proporcionan a continuación y en los ejemplos y las figuras. La actividad de señalización coestimuladora puede determinarse, por ejemplo, mediante el aumento de la liberación de citocinas, medido mediante ELISA (IL-2, IFN γ , TNF α), el aumento de la actividad proliferativa (medido mediante el aumento de la cantidad de células) o el aumento de la actividad lítica, medido mediante ensayos de liberación de LDH. Como se mencionó anteriormente, en una forma de realización de la presente invención, el dominio de señalización coestimulador del receptor de unión al antígeno puede derivarse de la actividad de los linfocitos T del gen CD28 y/o CD137 humano, definida como la producción de citocinas, la proliferación y la actividad lítica de la célula transducida descrita en la presente, como un linfocito T transducido. La actividad de CD28 y/o CD137 puede medirse mediante la liberación de citocinas mediante ELISA o citometría de flujo de citocinas como interferón-gamma (IFN- γ) o interleucina 2 (IL-2), la proliferación de linfocitos T medida, por ejemplo, mediante la medición de ki67, la cuantificación de células mediante citometría de flujo, o la actividad lítica evaluada

mediante la medición de la impedancia en tiempo real de la célula diana (usando, por ejemplo, un instrumento ICELLigence como se describe, por ejemplo, en Thakur *et al.*, Biosens Bioelectron. 35(1) (2012), 503-506; Krutzik *et al.*, Methods Mol Biol. 699 (2011), 179-202; Ekkens *et al.*, Infect Immun. 75(5) (2007), 2291-2296; Ge *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 99(5) (2002), 2983-2988; Düwell *et al.*, Cell Death Differ. 21(12) (2014), 1825-1837, Erratum in: Cell Death Differ. 21(12) (2014), 161).

Péptidos de señal y ligadores

Además, el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente puede comprender al menos un ligador (o "espaciador"). Un ligador suele ser un péptido con una longitud de hasta 20 aminoácidos. En consecuencia, en el contexto de la presente invención, el ligador puede tener una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos. Por ejemplo, el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente puede comprender un ligador entre el dominio extracelular que comprende al menos una porción de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado, el dominio transmembranario de anclaje, el dominio de señalización coestimulador y/o el dominio de señalización estimulador. Además, el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente puede comprender un ligador en la porción de unión al antígeno, en particular, entre los dominios de inmunoglobulina de la porción de unión al antígeno (como entre los dominios VH y VL de un scFv). Dichos ligadores tienen la ventaja de que aumentan la probabilidad de que los diferentes polipéptidos del receptor de unión al antígeno (es decir, el dominio extracelular que comprende al menos una porción de unión al antígeno, el dominio transmembranario de anclaje, el dominio de señalización coestimulador y/o el dominio de señalización estimulador) se plieguen de forma independiente y se comporten como se espera. De este modo, en el contexto de la presente invención, el dominio extracelular que comprende al menos una porción de unión al antígeno, el dominio transmembranario de anclaje, el dominio de señalización coestimulador y el dominio de señalización estimulador pueden estar comprendidos en un polipéptido multifuncional monocatenario. Un constructo de fusión monocatenario puede consistir, por ejemplo, en polipéptidos que comprenden dominios extracelulares que comprenden al menos una porción de unión al antígeno, dominios transmembranarios de anclaje, dominios de señalización coestimuladores y/o dominios de señalización estimuladores. En consecuencia, la porción de unión al antígeno, el dominio transmembranario de anclaje, el dominio de señalización coestimulador y el dominio de señalización estimulador pueden estar conectados mediante uno o más ligadores peptídicos idénticos o diferentes como se describe en la

presente. Por ejemplo, en el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente, el ligador entre el dominio extracelular que comprende al menos una porción de unión al antígeno y el dominio transmembranario de anclaje puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 17. En otra forma de realización, el ligador entre la porción de unión al antígeno y el dominio transmembranario de anclaje comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 19. En consecuencia, el dominio transmembranario de anclaje, el dominio de señalización coestimulador y/o el dominio estimulador pueden estar conectados entre sí mediante ligadores peptídicos o, alternativamente, mediante la fusión directa de los dominios.

En formas de realización preferidas de acuerdo con la invención, la porción de unión al antígeno comprendida en el dominio extracelular es un fragmento variable monocatenario (scFv) que es una proteína de fusión de los dominios variables de las cadenas pesada (VH) y liviana (VL) de un anticuerpo, conectada con un péptido ligador corto de diez a alrededor de 25 aminoácidos. En general, el ligador es rico en glicina para flexibilidad, así como serina o treonina para solubilidad, y puede conectar el extremo N de la VH con el extremo C de la VL, o *viceversa*. En una forma de realización preferida, el ligador conecta el extremo N del dominio VL con el extremo C del dominio VH. Por ejemplo, en el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente, el ligador puede tener la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:16. Los anticuerpos scFv se describen, por ejemplo, en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96).

En algunas formas de realización de acuerdo con la invención, la porción de unión al antígeno comprendida en el dominio extracelular es un fragmento Fab monocatenario o scFab que es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH), un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de la cadena liviana (VL) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena liviana (CL) de anticuerpo y un ligador, en donde dichos dominios de anticuerpo y dicho ligador tienen uno de los siguientes órdenes en la dirección del extremo N al extremo C: a) VH-CH1-ligador-VL-CL, b) VL-CL-ligador-VH-CH1, c) VH-CL-ligador-VL-CH1 o d) VL-CH1-ligador-VH-CL; y en donde dicho ligador es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferentemente, de entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab monocatenarios se estabilizan mediante el puente disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1.

El receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente o partes de este pueden comprender un péptido de señal. Tal péptido de señal llevará la proteína a la superficie de la membrana de los linfocitos T. Por ejemplo, en el receptor de unión al antígeno proporcionado en la presente, el péptido de señal puede tener el amino y la secuencia de

aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 100 (según fue codificada por la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO: 101).

Receptores de unión al antígeno activadores de linfocitos T capaces de unirse específicamente a dominios Fc mutados

Los componentes de los receptores de unión al antígeno descritos en la presente pueden fusionarse entre sí en una variedad de configuraciones para generar receptores de unión al antígeno activadores de linfocitos T.

En algunas formas de realización, el receptor de unión al antígeno comprende un dominio extracelular compuesto por un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena liviana (VL) conectado a un dominio transmembranario de anclaje. En formas de realización preferidas, el dominio VH está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio VL, opcionalmente a través de un ligador peptídico. En otras formas de realización, el receptor de unión al antígeno comprende además un dominio de señalización estimulador y/o un dominio de señalización coestimulador. En una forma de realización específica, el receptor de unión al antígeno consiste esencialmente en un dominio VH y un dominio VL, un dominio transmembranario de anclaje y, opcionalmente, un dominio de señalización estimulador, conectados mediante uno o más ligadores peptídicos, en donde el dominio VH está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio VL, y el dominio VL está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, en donde el dominio transmembranario de anclaje está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulador. Opcionalmente, el receptor de unión al antígeno comprende además un dominio de señalización coestimulador. En una forma de realización específica, el receptor de unión al antígeno consiste esencialmente en un dominio VH y un dominio VL, un dominio transmembranario de anclaje, un dominio de señalización estimulador y un dominio de señalización coestimulador conectados mediante uno o más ligadores peptídicos, en donde el dominio VH está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio VL, y el dominio VL está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, en donde el dominio transmembranario de anclaje está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulador, en donde el dominio de señalización estimulador está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio de señalización coestimulador. En una forma de realización alternativa, el dominio de señalización coestimulador está conectado al dominio transmembranario de anclaje en lugar del dominio de señalización estimulador. En una forma de realización preferida, el receptor de unión al antígeno consiste esencialmente en un dominio VH y un dominio VL,

un dominio transmembranario de anclaje, un dominio de señalización coestimulador y un dominio de señalización estimulador conectados mediante uno o más ligadores peptídicos, en donde el dominio VH está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio VL, y el dominio VL está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, en donde el dominio transmembranario de anclaje está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio de señalización coestimulador, en donde el dominio de señalización coestimulador está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulador.

La porción de unión al antígeno, el dominio transmembranario de anclaje y los dominios de señalización estimuladores y/o coestimuladores pueden fusionarse entre sí directamente o a través de uno o más ligadores peptídicos, que comprenden uno o más aminoácidos, normalmente alrededor de 2-20 aminoácidos. En el estado de la técnica se conocen ligadores peptídicos y se los describe en la presente. Los ligadores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los ligadores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en donde "n" es generalmente un número entre 1 y 10, normalmente entre 2 y 4. Un ligador peptídico preferido para conectar la porción de unión al antígeno y la porción transmembranaria de anclaje es GGGGS (G_4S) de acuerdo con SEQ ID NO 17. Otro ligador peptídico preferido para conectar la porción de unión al antígeno y la porción transmembranaria de anclaje es KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (CD8stalk) de acuerdo con SEQ ID NO 19. Un ejemplo de ligador peptídico adecuado para conectar el dominio variable de la cadena pesada (VH) y el dominio variable de la cadena liviana (VL) es GGGSGGGSGGGS $(G_4S)_4$ de acuerdo con SEQ ID NO 16.

Adicionalmente, los ligadores pueden comprender (una porción de) una región bisagra de inmunoglobulina. En particular, cuando una porción de unión al antígeno se fusiona al extremo N de un dominio transmembranario de anclaje, puede fusionarse a través de una región bisagra de inmunoglobulina o una parte de esta, con o sin un ligador peptídico adicional.

Como se describe en la presente, los receptores de unión al antígeno de la presente invención comprenden un dominio extracelular que comprende al menos una porción de unión al antígeno. Un receptor de unión al antígeno con una única porción de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno de la célula diana es útil y preferible, particularmente en los casos en donde se necesita una alta expresión del receptor de unión al antígeno. En estos casos, la presencia de más de una porción de unión al antígeno específica para el antígeno de la célula diana puede limitar la eficacia de la expresión del receptor de unión al antígeno. Sin embargo, en otros casos, será

ventajoso tener un receptor de unión al antígeno que comprenda dos o más moléculas de unión al antígeno específicas para un antígeno de la célula diana, por ejemplo, para optimizar el direccionamiento al sitio diana o para permitir la reticulación de los antígenos de la célula diana.

En una forma de realización particular, el receptor de unión al antígeno comprende una porción de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado, en particular un dominio Fc de IgG1, que comprende la mutación P329G (de acuerdo con la numeración EU). En una forma de realización, la porción de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado, pero no capaz de unirse específicamente al dominio Fc matriz no mutado, es un scFv.

En una forma de realización, la porción de unión al antígeno se fusiona en el extremo C del fragmento scFv al extremo N de un dominio transmembranario de anclaje, opcionalmente mediante un ligador peptídico. En una forma de realización, el ligador peptídico comprende la secuencia de aminoácidos KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 19). En una forma de realización, el dominio transmembranario de anclaje es un dominio transmembranario seleccionado del grupo que consiste en el dominio transmembranario de CD8, CD4, CD3z, FCGR3A, NKG2D, CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 o DAP12 o un fragmento de este. En una forma de realización preferida, el dominio transmembranario de anclaje es el dominio transmembranario de CD8 o un fragmento de este. En una forma de realización particular, el dominio transmembranario de anclaje comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de IYIWAPLAGTCGVLLSLVIT (SEQ ID NO: 11). En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno comprende además un dominio de señalización coestimulador (CSD). En una forma de realización, el dominio transmembranario de anclaje del receptor de unión al antígeno está fusionado en el extremo C al extremo N de un dominio de señalización coestimulador. En una forma de realización, el dominio de señalización coestimulador se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 y de DAP12, o fragmentos de estos, como se describió anteriormente en la presente. En una forma de realización preferida, el dominio de señalización coestimulador es el dominio intracelular de CD28 o un fragmento de este. En una forma de realización preferida, el dominio de señalización coestimulador comprende el dominio intracelular de CD28 o un fragmento de este que conserva la señalización de CD28. En otra forma de realización preferida, el dominio de señalización coestimulador comprende el dominio intracelular de CD137 o un fragmento de este que conserva la señalización de CD137. En una forma de realización particular, el dominio de

señalización coestimulador comprende o consiste en SEQ ID NO: 12. En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno comprende además un dominio de señalización estimulador. En una forma de realización, el dominio de señalización coestimulador del receptor de unión al antígeno está fusionado en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulador. En una forma de realización, el al menos un dominio de señalización estimulador se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD3z, FCGR3A y NKG2D, o fragmentos de estos. En una de realización preferida, el dominio de señalización coestimulador es el dominio intracelular de CD3z o un fragmento de este que conserva la señalización de CD3z. En una forma de realización particular, el dominio de señalización coestimulador comprende o consiste en SEQ ID NO: 13.

En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno se fusiona a una proteína indicadora, en particular a GFP o análogos mejorados de esta. En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N de la eGFP (proteína verde fluorescente mejorada), opcionalmente mediante un ligador peptídico como se describe en la presente. En una forma de realización preferida, el ligador peptídico es GEGRGSLTTCGDVEENPGP (T2A) de acuerdo con SEQ ID NO: 18.

En una forma de realización particular, el receptor de unión al antígeno comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende al menos una molécula de unión al antígeno, en donde la al menos una molécula de unión al antígeno es un scFv capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado, pero no es capaz de unirse específicamente al dominio Fc matriz no mutado, en donde el dominio Fc mutado comprende la mutación P329G (de acuerdo con la numeración EU). La mutación P329G reduce la unión al receptor Fcγ. En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno de la invención comprende un dominio transmembranario de anclaje (ATD), un dominio de señalización coestimulador (CSD) y un dominio de señalización estimulador (SSD). En una forma de realización similar, el receptor de unión al antígeno tiene la configuración scFv-ATD-CSD-SSD. En una forma de realización preferida, el receptor de unión al antígeno tiene la configuración VH-VL-ATD-CSD-SSD. En una forma de realización similar más específica, el receptor de unión al antígeno tiene la configuración VH-ligador-VL-ligador-ATD-CSD-SSD.

En una forma de realización particular, la porción de unión al antígeno es un scFv capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en donde la porción de unión al antígeno comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y al menos una CDR de la

cadena liviana seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

En otra forma de realización particular, la porción de unión al antígeno es un scFv capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en donde la porción de unión al antígeno comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 3 y al menos una CDR de la cadena liviana seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

En una forma de realización preferida, la porción de unión al antígeno es un scFv capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en donde la porción de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR H) 1 RYWMN (SEQ ID NO: 1), la secuencia de aminoácidos de la CDR H2 EITPDSSTINYAPSLKG (SEQ ID NO: 2), la secuencia de aminoácidos de la CDR H3 PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (CDR L) 1 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos de la CDR L2 GTNKRAP (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de aminoácidos de la CDR L3 ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

En una forma de realización, la presente invención proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

- (i) un dominio variable (VH) de la cadena pesada que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 3,
- (ii) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 16,
- (iii) un dominio variable de cadena liviana (VL) que comprende la CDR 1 de la cadena liviana de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena liviana de SEQ ID NO: 5 y la CDR 3 de la cadena liviana de SEQ ID NO: 6,
- (iv) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 19,
- (v) un dominio transmembranario de anclaje, en particular el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11,
- (vi) un dominio de señalización coestimulador, en particular el dominio de señalización coestimulador de SEQ ID NO: 12, y
- (vii) un dominio de señalización estimulador, en particular el dominio de señalización estimulador de SEQ ID NO: 13.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

- (i) un dominio variable (VH) de la cadena pesada que comprende la región determinante

de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 40, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 3,

- (ii) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 16,
- (iii) un dominio variable de cadena liviana (VL) que comprende la CDR 1 de la cadena liviana de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena liviana de SEQ ID NO: 5 y la CDR 3 de la cadena liviana de SEQ ID NO: 6,
- (iv) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 19,
- (v) un dominio transmembranario de anclaje, en particular el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11,
- (vi) un dominio de señalización coestimulador, en particular el dominio de señalización coestimulador de SEQ ID NO: 12, y
- (vii) un dominio de señalización estimulador, en particular el dominio de señalización estimulador de SEQ ID NO: 13.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende en orden desde el extremo N hasta el extremo C

- (i) un dominio variable de la cadena pesada (VH),
- (ii) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 16,
- (iii) un dominio variable de la cadena liviana (VL) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9,

en donde los dominios VH y VL son capaces de formar una porción de unión al antígeno que se une a un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU.

- (iv) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 19,
- (v) un dominio transmembranario de anclaje, en particular un dominio transmembranario de anclaje que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11,
- (vi) un dominio de señalización coestimulador, en particular un dominio de señalización coestimulador que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, y
- (vii) un dominio de señalización estimulador, en particular un dominio de señalización estimulador que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende en orden desde el extremo N hasta el extremo C

- (i) un dominio variable de la cadena pesada (VH) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1,

96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8,

(ii) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 16,

(iii) un dominio variable de la cadena liviana (VL) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9,

(iv) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 19,

(v) un dominio transmembranario de anclaje, en particular un dominio transmembranario de anclaje que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11,

(vi) un dominio de señalización coestimulador, en particular un dominio de señalización coestimulador que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, y

(vii) un dominio de señalización estimulador, en particular un dominio de señalización estimulador que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende en orden desde el extremo N hasta el extremo C

(i) un dominio variable de la cadena pesada (VH) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41,

(ii) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 16,

(iii) un dominio variable de la cadena liviana (VL) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9,

(iv) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 19,

(v) un dominio transmembranario de anclaje, en particular un dominio transmembranario de anclaje que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11,

(vi) un dominio de señalización coestimulador, en particular un dominio de señalización coestimulador que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, y

(vii) un dominio de señalización estimulador, en particular un dominio de señalización estimulador que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un receptor de unión al

antígeno que comprende en orden desde el extremo N hasta el extremo C

(i) un dominio variable de la cadena pesada (VH) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44,

(ii) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 16,

(iii) un dominio variable de la cadena liviana (VL) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9,

(iv) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 19,

(v) un dominio transmembranario de anclaje, en particular un dominio transmembranario de anclaje que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11,

(vi) un dominio de señalización coestimulador, en particular un dominio de señalización coestimulador que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, y

(vii) un dominio de señalización estimulador, en particular un dominio de señalización estimulador que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende en orden desde el extremo N hasta el extremo C

(i) un dominio variable de la cadena pesada (VH) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:126,

(ii) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 16,

(iii) un dominio variable de la cadena liviana (VL) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:127,

(iv) un ligador peptídico, en particular el ligador peptídico de SEQ ID NO: 19,

(v) un dominio transmembranario de anclaje, en particular un dominio transmembranario de anclaje que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11,

(vi) un dominio de señalización coestimulador, en particular un dominio de señalización coestimulador que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, y

(vii) un dominio de señalización estimulador, en particular un dominio de señalización estimulador que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %

idéntico con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 7. En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 7.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 121. En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 121.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 123. En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 123.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 125. En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 125.

En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno se fusiona a una proteína indicadora, en particular a GFP o análogos mejorados de esta. En una forma de realización, el receptor de unión al antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N de la eGFP (proteína verde fluorescente mejorada), opcionalmente mediante un ligador peptídico como se describe en la presente. En una forma de realización preferida, el ligador peptídico es GEGRGSLTTCGDVEENPGP (T2A) de SEQ ID NO: 18.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129. En dicha forma de realización, el receptor de unión al antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que

comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132.

En una forma de realización, se proporciona un receptor de unión al antígeno como se describe en la presente, en donde el receptor de unión al antígeno no comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19.

Células transducidas capaces de expresar los receptores de unión al antígeno de la invención

Otro aspecto de la presente invención son los linfocitos T transducidos capaces de expresar un receptor de unión al antígeno de la presente invención. Los receptores de unión al antígeno descritos en la presente se refieren a moléculas que naturalmente no están comprendidas en y/o sobre la superficie de los linfocitos T y que no se expresan (endógenamente) en o sobre los linfocitos T normales (no transducidos). De este modo, el receptor de unión al antígeno de la invención en y/o sobre los linfocitos T se introduce artificialmente en los linfocitos T. En el contexto de la presente invención, dichos linfocitos T, preferentemente los linfocitos T CD8+, pueden ser aislados/obtenidos de un sujeto por tratar como se define en la presente. En consecuencia, los receptores de unión al antígeno descritos en la presente que se introducen artificialmente y se presentan posteriormente en y/o sobre la superficie de dichos linfocitos T comprenden dominios que comprenden una o más porciones de unión al antígeno accesibles (*in vitro* o *in vivo*) a inmunoglobulinas (derivadas de Ig), preferentemente anticuerpos, en particular al dominio Fc de los anticuerpos. En el contexto de la presente invención, estas moléculas introducidas artificialmente se presentan en y/o sobre la superficie de dichos linfocitos T después de la transducción (retroviral, lentiviral o no viral) como se describe a continuación en la presente. En consecuencia, después de la transducción, los linfocitos T de acuerdo con la invención pueden ser activados por inmunoglobulinas, preferentemente anticuerpos (terapéuticos) que comprenden mutaciones específicas en el dominio Fc como se describe en la presente y en presencia de células diana.

La invención también se refiere a linfocitos T transducidos que expresan un receptor de unión al antígeno codificado por moléculas de ácido nucleico que codifican el receptor de unión al antígeno de la presente invención. En consecuencia, en el contexto de la

presente invención, la célula transducida puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de unión al antígeno de la presente invención o un vector de la presente invención que expresa un receptor de unión al antígeno de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, el término "linfocito T transducido" se refiere a un linfocito T modificado genéticamente (es decir, un linfocito T en donde se ha introducido deliberadamente una molécula de ácido nucleico). El linfocito T transducido proporcionado en la presente puede comprender el vector de la presente invención. Preferentemente, el linfocito T transducido proporcionado en la presente comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de unión al antígeno de la presente invención y/o el vector de la presente invención. El linfocito T transducido de la invención puede ser un linfocito T que expresa de forma transitoria o estable el ADN extraño (es decir, la molécula de ácido nucleico que se ha introducido en el linfocito T). En particular, la molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de unión al antígeno de la presente invención puede integrarse de forma estable en el genoma del linfocito T usando una transducción retroviral o lentiviral. Al usar la transfección de ARNm, la molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de unión al antígeno de la presente invención puede expresarse transitoriamente. Preferentemente, el linfocito T transducido proporcionado en la presente ha sido modificado genéticamente introduciendo una molécula de ácido nucleico en el linfocito T a través de un vector viral (por ejemplo, un vector retroviral o un vector lentiviral). En consecuencia, la expresión de los receptores de unión al antígeno puede ser constitutiva y el dominio extracelular del receptor de unión al antígeno puede ser detectable en la superficie celular. Este dominio extracelular del receptor de unión al antígeno puede comprender el dominio extracelular completo de un receptor de unión al antígeno como se define en la presente, pero también partes de este. El tamaño mínimo requerido es el sitio de unión al antígeno de la porción de unión al antígeno en el receptor de unión al antígeno.

La expresión también puede ser condicional o inducible en el caso de que el receptor de unión al antígeno se introduzca en los linfocitos T bajo el control de un promotor inducible o reprimible. Ejemplos de tales promotores inducibles o reprimibles pueden ser un sistema transcripcional que contiene el promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa I (alcA) y la proteína transactivadora AlcR. Se usan diferentes formulaciones a base de alcohol agrícola para controlar la expresión de un gen de interés ligado al promotor alcA. Además, los sistemas promotores que responden a la tetraciclina pueden funcionar tanto para activar como para reprimir el sistema de expresión génica en presencia de la tetraciclina. Algunos de los elementos de los sistemas incluyen una proteína represora de

tetraciclina (TetR), una secuencia operadora de tetraciclina (tetO) y una proteína de fusión transactivadora de tetraciclina (tTA), que es la fusión de TetR y una secuencia de activación de la proteína 16 del virus del herpes simple (VP16). Además, se pueden usar promotores que respondan a esteroides, promotores regulados por metales o relacionados con la proteína de la patogénesis (PR).

La expresión puede ser constitutiva o constitucional, según el sistema usado. Los receptores de unión al antígeno de la presente invención pueden expresarse en la superficie del linfocito T transducido proporcionado en la presente. La porción extracelular del receptor de unión al antígeno (es decir, el dominio extracelular del receptor de unión al antígeno puede detectarse en la superficie celular, mientras que la porción intracelular (es decir, el o los dominios de señalización coestimuladores y el dominio de señalización estimulador) no son detectables en la superficie celular. La detección del dominio extracelular del receptor de unión al antígeno puede llevarse a cabo usando un anticuerpo que se une específicamente a este dominio extracelular o mediante el dominio Fc mutado que el dominio extracelular es capaz de unir. El dominio extracelular puede detectarse usando estos anticuerpos o los dominios Fc mediante citometría de flujo o microscopia.

Otras células también pueden ser transducidas con los receptores de unión al antígeno de la invención y, por lo tanto, ser dirigidas contra las células diana. Estas células adicionales incluyen, entre otras, los linfocitos B, las células natural killer (NK), las células linfoides innatas, los macrófagos, los monocitos, las células dendríticas o los neutrófilos. Preferentemente, dicha célula inmunitaria sería un linfocito. La activación del receptor de unión al antígeno de la presente invención en la superficie del leucocito hará que la célula sea citotóxica contra una célula diana junto con un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, independientemente del linaje del que proceda la célula. La citotoxicidad se producirá independientemente del dominio de señalización estimulador o del dominio de señalización coestimulador elegido para el receptor de unión al antígeno y no depende del suministro exógeno de citocinas adicionales. En consecuencia, la célula transducida de la presente invención puede ser, por ejemplo, un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+, un linfocito T $\gamma\delta$, un linfocito T natural killer (NK), una célula natural killer (NK), un linfocito infiltrante de tumores (TIL), una célula mieloide o una célula madre mesenquimatosas. Preferentemente, la célula transducida proporcionada en la presente es un linfocito T (por ejemplo, un linfocito T autólogo), más preferentemente, la célula transducida es un linfocito T CD8+. En consecuencia, en el contexto de la presente invención, la célula transducida es un linfocito T CD8+. Además, en el contexto de la presente invención, la célula transducida es un linfocito T autólogo. En consecuencia, en

el contexto de la presente invención, la célula transducida es preferentemente un linfocito T CD8+ autólogo. Además del uso de células autólogas (por ejemplo, linfocitos T) aisladas del sujeto, la presente invención también comprende el uso de células alogénicas. En consecuencia, en el contexto de la presente invención, la célula transducida también puede ser una célula alogénica, como un linfocito T CD8+ alogénico. El término alogénico se refiere a las células procedentes de un individuo/sujeto donante no emparentado que es el antígeno leucocitario humano (HLA) compatible con el individuo/sujeto que será tratado por, por ejemplo, la célula transducida que expresa el receptor de unión al antígeno que se describe en la presente. Las células autólogas se refieren a las células aisladas/obtenidas como se describió anteriormente del sujeto que va a ser tratado con la célula transducida descrita en la presente.

La célula transducida de la invención puede ser cotransducida con otras moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, con una molécula de ácido nucleico que codifica una citocina.

La presente invención también se refiere a un método para la producción de un linfocito T transducido que expresa un receptor de unión al antígeno de la invención, que comprende las etapas de transducir un linfocito T con un vector de la presente invención, cultivar el linfocito T transducido en condiciones que permitan la expresión del receptor de unión al antígeno en o sobre dicho linfocito transducido y recuperar dicho linfocito T transducido.

En el contexto de la presente invención, la célula transducida de la presente invención se produce preferentemente mediante el aislamiento de células (por ejemplo, linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+) de un sujeto (preferentemente un paciente humano). Los métodos para aislar/obtener células (por ejemplo, linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+) de pacientes o de donantes son bien conocidos en el estado de la técnica y en el contexto de las presentes células (por ejemplo, linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+) de pacientes o de donantes, por ejemplo, las células pueden aislarse mediante extracción de sangre o de médula ósea. Después de aislar/obtener células como muestra del paciente, las células (por ejemplo, linfocitos T) se separan de los demás ingredientes de la muestra. Se conocen varios métodos para separar células (por ejemplo, linfocitos T) de la muestra e incluyen, entre otros, por ejemplo, la leucaféresis para obtener células de la muestra de sangre periférica de un paciente o de un donante, aislando/obteniendo células mediante un aparato de clasificación celular FACS. Los linfocitos T aislados/obtenidos se cultivan y expanden posteriormente, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-CD3, usando anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 y/o usando un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo

anti-CD28 e interleucina-2 (IL-2) (ver, por ejemplo, Dudley, *Immunother.* 26 (2003), 332-342 o Dudley, *Clin. Oncol.* 26 (2008), 5233-5239).

En una etapa posterior, las células (por ejemplo, linfocitos T) se modifican/transducen artificialmente/por ingeniería genética mediante métodos conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Lemoine, *J Gene Med* 6 (2004), 374-386). Los métodos para transducir células (por ejemplo, linfocitos T) son conocidos en el estado de la técnica e incluyen, entre otros, en un caso en donde se transduce ácido nucleico o un ácido nucleico recombinante, por ejemplo, un método de electroporación, un método de fosfato de calcio, un método de lípidos catiónicos o un método de liposomas. El ácido nucleico por transducir puede ser transducido de forma convencional y altamente eficiente usando un reactivo de transfección disponible en el mercado, por ejemplo, Lipofectamine (fabricado por Invitrogen, catálogo N.º: 11668027). En el caso de que se use un vector, este puede transducirse de la misma manera que el ácido nucleico mencionado anteriormente, siempre que el vector sea un vector plasmídico (es decir, un vector que no sea un vector viral. En el contexto de la presente invención, los métodos para transducir células (por ejemplo, linfocitos T) incluyen la transducción de linfocitos T retroviral o lentiviral, vectores no virales (por ejemplo, el vector minicírculo de la bella durmiente), así como la transfección de ARNm. "Transfección de ARNm" se refiere a un método bien conocido por las personas del oficio de nivel medio para expresar transitoriamente una proteína de interés, como en el presente caso el receptor de unión al antígeno de la presente invención, en una célula por transducir. En resumen, las células pueden electroporarse con el ARNm que codifica el receptor de unión al antígeno de la presente usando un sistema de electroporación (tal como, por ejemplo, Gene Pulser, Bio-Rad) y, a continuación, cultivarse mediante un protocolo estándar de cultivo celular (por ejemplo, linfocitos T) como se describió anteriormente (ver Zhao *et al.*, *Mol Ther.* 13(1) (2006), 151-159.) La célula transducida de la invención puede ser generada por transducción lentiviral o, con máxima preferencia, retroviral.

En este contexto, en el estado de la técnica se conocen vectores retrovirales adecuados para transducir células, tales como SAMEN CMV/SRa (Clay *et al.*, *J. Immunol.* 163 (1999), 507-513), LZRS-id3-IHRES (Heemskerk *et al.*, *J. Exp. Med.* 186 (1997), 1597-1602), FeLV (Neil *et al.*, *Nature* 308 (1984), 814-820), SAX (Kantoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986), 6563-6567), pDOL (Desiderio, *J. Exp. Med.* 167 (1988), 372-388), N2 (Kasid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 473-477), LNL6 (Tiberghien *et al.*, *Blood* 84 (1994), 1333-1341), pZipNEO (Chen *et al.*, *J. Immunol.* 153 (1994), 3630-3638), LASN (Mullen *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996), 1123-1129), pG1XsNa (Taylor *et al.*, *J. Exp. Med.* 184 (1996), 2031-2036), LCNX (Sun *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 8 (1997),

1041-1048), SFG (Gallardo *et al.*, Blood 90 (1997), y LXS_N (Sun *et al.*, Hum. Gene Ther. 8 (1997), 1041-1048), SFG (Gallardo *et al.*, Blood 90 (1997), 952-957), HMB-Hb-Hu (Vieillard *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 11595-11600), pMV7 (Cochlovius *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 46 (1998), 61-66), pSTITCH (Weitjens *et al.*, Gene Ther 5 (1998), 1195-1203), pLZR (Yang *et al.*, Hum. Gene Ther. 10 (1999), 123-132), pBAG (Wu *et al.*, Hum. Gene Ther. 10 (1999), 977-982), rKat.43.267bn (Gilham *et al.*, J. Immunother. 25 (2002), 139-151), pLGS_N (Engels *et al.*, Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168), pMP71 (Engels *et al.*, Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168), pGCSAM (Morgan *et al.*, J. Immunol. 171 (2003), 3287-3295), pMSGV (Zhao *et al.*, J. Immunol. 174 (2005), 4415-4423), o pMX (de Witte *et al.*, J. Immunol. 181 (2008), 5128-5136). En el contexto de la presente invención, los vectores lentivirales adecuados para transducir células (por ejemplo, linfocitos T) son, por ejemplo, el vector lentiviral PL-SIN (Hotta *et al.*, Nat Methods. 6(5) (2009), 370-376), p156RRL-sinPPT-CMV-GFP-PRE/NheI (Campeau *et al.*, PLoS One 4(8) (2009), e6529), pCMVR8.74 (Catálogo Addgene N.º: 22036), FUGW (Lois *et al.*, Science 295(5556) (2002), 868-872), pLVX-EF1 (Catálogo Addgene N.º: 64368), pLVE (Brunger *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 111(9) (2014), E798-806), pCDH1-MCS1-EF1 (Hu *et al.*, Mol Cancer Res. 7(11) (2009), 1756-1770), pSLIK (Wang *et al.*, Nat Cell Biol. 16(4) (2014), 345-356), pLJM1 (Solomon *et al.*, Nat Genet. 45(12) (2013), 1428-30), pLX302 (Kang *et al.*, Sci Signal. 6(287) (2013), rs13), pHR-IG (Xie *et al.*, J Cereb Blood Flow Metab. 33(12) (2013), 1875-85), pRRLSIN (Catálogo Addgene N.º: 62053), pLS (Miyoshi *et al.*, J Virol. 72(10) (1998), 8150-8157), pLL3.7 (Lazebnik *et al.*, J Biol Chem. 283(7) (2008), 11078-82), FRIG (Raissi *et al.*, Mol Cell Neurosci. 57 (2013), 23-32), pWPT (Ritz-Laser *et al.*, Diabetologia. 46(6) (2003), 810-821), pBOB (Marr *et al.*, J Mol Neurosci. 22(1-2) (2004), 5-11), o pLEX (Catálogo Addgene N.º: 27976).

Las células transducidas de la presente invención se cultivan preferentemente en condiciones controladas, fuera de su entorno natural. En particular, el término "cultivar" significa que las células (por ejemplo, las células transducidas de la invención) que se derivan de eucariotas multicelulares (preferentemente de un paciente humano) se cultivan *in vitro*. El cultivo de células es una técnica de laboratorio que consiste en mantener vivas las células separadas de su fuente de tejido original. En la presente, la célula transducida de la presente invención se cultiva en condiciones que permiten la expresión del receptor de unión al antígeno de la presente invención en o sobre dichas células transducidas. Las condiciones que permiten la expresión o un transgén (es decir, del receptor de unión al antígeno de la presente invención) son comúnmente conocidas en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, anticuerpos agonistas anti-CD3- y anti-CD28 y la adición de citocinas como interleucina 2 (IL-2), interleucina 7 (IL-7), interleucina

12 (IL-12) y/o interleucina 15 (IL-15). Tras la expresión del receptor de unión al antígeno de la presente invención en la célula transducida cultivada (por ejemplo, un linfocito T CD8+), la célula transducida se recupera (es decir, se vuelve a extraer) del cultivo (es decir, del medio de cultivo).

En consecuencia, también está comprendida en la invención una célula transducida, preferentemente un linfocito T, en particular un linfocito T CD8+ que expresa un receptor de unión al antígeno codificado por una molécula de ácido nucleico de la invención obtenible mediante el método de la presente invención.

Moléculas de ácido nucleico

Otro aspecto de la presente invención son los ácidos nucleicos y vectores que codifican uno o varios receptores de unión al antígeno de la presente invención. Una molécula de ácido nucleico de ejemplo que codifica los receptores de unión al antígeno de la presente invención se muestra en SEQ ID NO:20. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden estar bajo el control de secuencias reguladoras. Por ejemplo, pueden emplearse promotores, potenciadores transcripcionales y/o secuencias que permiten la expresión inducida del receptor de unión al antígeno de la invención. En el contexto de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico se expresan bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. Algunos promotores adecuados son, por ejemplo, el promotor CMV (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor UBC (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), PGK (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor EF1A (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor CAGG (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor SV40 (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor COPIA (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor ACT5C (Qin et al., PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor TRE (Qin et al. 5(5) (2010), e10611), el promotor Oct3/4 (Chang et al., Molecular Therapy 9 (2004), S367–S367 (doi: 10.1016/j.ymthe.2004.06.904)) o el promotor Nanog (Wu et al., Cell Res. 15(5) (2005), 317-24). Por lo tanto, la presente invención también se refiere a vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente invención. En la presente, el término vector se refiere a una molécula de ácido nucleico circular o lineal que puede replicarse de forma autónoma en una célula en donde se ha introducido. Los expertos en biología molecular conocen muchos vectores adecuados, cuya elección dependerá de la función deseada e incluye plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores usados convencionalmente en ingeniería genética. Para construir diversos plásmidos y vectores pueden usarse métodos bien conocidos por las personas del oficio de nivel medio; ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (loc cit.) y

Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989), (1994). Alternativamente, los polinucleótidos y vectores de la invención pueden reconstituirse en liposomas para su administración a las células diana. Como se explica más adelante, se usó un vector de clonación para aislar secuencias individuales de ADN. Las secuencias pertinentes pueden transferirse a vectores de expresión cuando se requiera la expresión de un polipéptido particular. Los vectores de clonación típicos son pBluescript SK, pGEM, pUC9, pBR322, pGA18 y pGBT9. Los vectores de expresión típicos son pTRE, pCAL-n-EK, pESP-1, pOP13CAT.

La invención también se refiere a vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que son una secuencia reguladora ligada operativamente a dichas moléculas de ácido nucleico que codifican un receptor de unión al antígeno como se define en la presente. En el contexto de la presente invención, el vector puede ser policistrónico. Dichas secuencias reguladoras (elementos de control) son conocidas por la persona del oficio de nivel medio y pueden incluir un promotor, un casete de empalme, un codón de iniciación de la traducción y un sitio de traducción e inserción para introducir un inserto en los vectores. En el contexto de la presente invención, dichas moléculas de ácido nucleico están ligadas operativamente a dichas secuencias de control de expresión, lo que permite la expresión en células eucariotas o procariotas. Se prevé que dichos vectores sean vectores de expresión que comprendan las moléculas de ácido nucleico que codifican el receptor de unión al antígeno como se define en la presente. Ligado operativamente se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la forma prevista. Una secuencia de control ligada operativamente a una secuencia codificadora se liga de tal forma que la expresión de la secuencia codificadora se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control. En el caso de que la secuencia de control sea un promotor, es obvio para una persona del oficio de nivel medio que se usa preferentemente ácido nucleico bicatenario. En el contexto de la presente invención, los vectores mencionados son vectores de expresión. Un vector de expresión es un constructo que puede usarse para transformar una célula seleccionada y que proporciona la expresión de una secuencia codificadora en la célula seleccionada. Los vectores de expresión pueden ser, por ejemplo, vectores de clonación, vectores binarios o vectores de integración. La expresión comprende la transcripción de la molécula de ácido nucleico preferentemente en un ARNm traducible. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en células procariotas y/o eucariotas son bien conocidos por las personas del oficio de nivel medio. En el caso de las células eucariotas, comprenden normalmente promotores que aseguran el inicio de la transcripción y, opcionalmente, señales poli-A que aseguran la terminación de la

transcripción y la estabilización del transcripto. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procariotas comprenden, por ejemplo, el promotor PL, lac, trp o tac en *E. coli*, y algunos ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en la levadura o el promotor CMV, SV40, RSV (virus del sarcoma de Rous), el potenciador CMV, el potenciador SV40 o un intrón de globina en células de mamíferos y otros animales.

Además de los elementos responsables de la iniciación de la transcripción, dichos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de transcripción, tal como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, corriente abajo del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, pueden agregarse a la secuencia codificadora de la secuencia de ácido nucleico mencionada secuencias líder que codifican péptidos de señal capaces de dirigir el polipéptido a un compartimento celular o de secretarlo en el medio, y que son bien conocidas en el estado de la técnica. Ver también, por ejemplo, los ejemplos adjuntos.

Las secuencias líder están ensambladas en fase apropiada con las secuencias de traducción, iniciación y terminación y, preferentemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una porción de esta, al espacio periplásmico o al medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar un receptor de unión al antígeno que incluye un péptido de identificación del extremo N que imparte las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. Ver supra. En este contexto, se conocen vectores de expresión adecuados en el estado de la técnica, tales como el vector de expresión de ADNc Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-vitrogene), pEF-DHFR, pEF-ADA o pEF-neo (Raum *et al.* Cancer Immunol Immunother 50 (2001), 141-150) o pSPORT1 (GIBCO BRL).

En el contexto de la presente invención, las secuencias de control de expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células eucariotas, pero también pueden usarse secuencias de control para células procariotas. Una vez que el vector se ha incorporado a la célula apropiada, la célula se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y según se desee. Otros elementos reguladores pueden incluir potenciadores transcripcionales y traslacionales. Ventajosamente, los vectores de la invención descritos anteriormente comprenden un marcador seleccionable y/o susceptible de puntuación. Los genes marcadores seleccionables útiles para la selección de células transformadas y, por ejemplo, de tejidos vegetales y plantas, son bien conocidos por las personas del oficio de

nivel medio y comprenden, por ejemplo, la resistencia a los antimetabolitos como base de la selección para dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994), 143-149), npt, que confiere resistencia a los aminoglucósidos neomicina, kanamicina y paromicina (Herrera-Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987-995) e higo, que confiere resistencia a la higromicina (Marsh, Gene 32 (1984), 481-485). Se han descrito otros genes seleccionables, a saber: trpB, que permite a las células usar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células usar histinol en lugar de histidina (Hartman, Proc. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047); manosa-6-fosfato isomerasa, que permite a las células usar manosa (WO 94/20627) y ODC (ornitina descarboxilasa), que confiere resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) o desaminasa de *Aspergillus terreus*, que confiere resistencia a la blasticidina S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336-2338).

Las personas del oficio de nivel medio también conocen los marcadores susceptibles de puntuación útiles y están disponibles en el mercado. Ventajosamente, dicho marcador es un gen que codifica la luciferasa (Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59-72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121), la proteína verde fluorescente (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47) o la β -glucuronidasa (Jefferson, EMBO J. 6 (1987), 3901-3907). Esta forma de realización es particularmente útil para el cribado simple y rápido de células, tejidos y organismos que contienen un vector mencionado.

Como se describió anteriormente, las moléculas de ácido nucleico mencionadas pueden usarse solas o como parte de vectores para expresar los receptores de unión al antígeno de la invención en células, para, por ejemplo, el tratamiento adoptivo de linfocitos T, pero también para fines de tratamiento génico. Las moléculas de ácido nucleico o los vectores que contienen las secuencias de ADN que codifican cualquiera de los receptores de unión al antígeno descritos en la presente se introducen en las células que, a su vez, producen el polipéptido de interés. El tratamiento génico, que se basa en la introducción de genes terapéuticos en las células mediante técnicas *ex vivo* o *in vivo*, es una de las aplicaciones más importantes de la transferencia génica. En la literatura se describen vectores, métodos o sistemas de administración de genes adecuados para métodos o sistemas de administración de genes para tratamiento génico *in vitro* o *in vivo*, que son conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Ver, por ejemplo, Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91 (1998), 30-36; Verma,

Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci. 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957; US 5.580.859; US 5.589.466; o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640. Las moléculas de ácido nucleico mencionadas y los vectores pueden estar diseñados para la introducción directa o para la introducción a través de liposomas, o vectores virales (por ejemplo, adenoviral, retroviral) en la célula. En el contexto de la presente invención, dicha célula es un linfocito T, como los linfocitos T CD8+, los linfocitos T CD4+, los linfocitos T CD3+, los linfocitos T $\gamma\delta$ o los linfocitos T natural killer (NK), preferentemente los linfocitos T CD8+.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a métodos para derivar vectores, particularmente plásmidos, cósmidos y bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de polipéptidos de un receptor de unión al antígeno definido en la presente. En el contexto de la presente invención, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia génica o dirigido a genes. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus de la vaccinia, virus adeno-asociado, virus del herpes o virus del papiloma bovino, pueden usarse para la administración de los polinucleótidos mencionados o el vector en las poblaciones celulares diana.

Para construir vectores recombinantes pueden usarse métodos bien conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (loc cit.), Ausubel (1989, loc cit.) u otros libros de texto estándares. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico y los vectores mencionados pueden reconstituirse en liposomas para su administración a las células diana. Los vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden transferirse a la célula huésped mediante métodos bien conocidos, que varían según el tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se usa habitualmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación pueden usarse para otros huéspedes celulares. Ver Sambrook, supra. El vector mencionado puede ser, entre otros, pEF-DHFR, pEF-ADA o pEF-neo. Los vectores pEF-DHFR, pEF-ADA y pEF-neo se han descrito en el estado de la técnica, por ejemplo, en Mack *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-7025 y Raum *et al.* Cancer Immunol Immunother 50 (2001), 141-150.

La invención también proporciona un linfocito T transducido con un vector como se describe en la presente. Dicho linfocito T puede producirse introduciendo al menos uno de los vectores descritos anteriormente o al menos una de las moléculas de ácido

nucleico descritas anteriormente en el linfocito T o en su célula precursora. La presencia de dicho al menos un vector o al menos una molécula de ácido nucleico en el linfocito T media la expresión de un gen que codifica el receptor de unión al antígeno descrito anteriormente, que comprende un dominio extracelular que comprende una porción de unión al antígeno capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado. El vector de la presente invención puede ser policistrónico.

Las moléculas de ácido nucleico o los vectores descritos que se introducen en el linfocito T o en su célula precursora pueden integrarse en el genoma de la célula o pueden mantenerse extracromosómicamente.

Antígenos de células diana

Como se mencionó anteriormente, los dominios (derivados de Ig) del anticuerpo descrito en la presente que comprenden un dominio Fc mutado, en particular un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G (de acuerdo con la numeración EU), comprenden un sitio de interacción con el antígeno con especificidad para una molécula de la superficie de la célula diana, por ejemplo, un antígeno específico del tumor que se encuentra naturalmente en la superficie de una célula tumoral. En el contexto de la presente invención, tales anticuerpos pondrán en contacto físico a los linfocitos T transducidos descritos en la presente que comprenden el receptor de unión al antígeno de la invención con una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral), en donde se activa el linfocito T transducido. La activación de los linfocitos T transducidos de la presente invención da lugar preferentemente a la lisis de la célula diana como se describe en la presente.

A continuación se indican ejemplos de antígenos de células diana (por ejemplo, marcadores tumorales) que se encuentran naturalmente en la superficie de las células (por ejemplo, tumorales) y comprenden, entre otros, FAP (proteína de activación de fibroblastos), CEA (antígeno carcinoembrionario), p95 (p95HER2), BCMA (antígeno de maduración de linfocitos B), EpCAM (molécula de adhesión a la célula epitelial), MSLN (mesotelina) MCSP (proteoglicano de sulfato de condroitina de melanoma), HER-1 (factor de crecimiento epidérmico humano 1), HER-2 (factor de crecimiento epidérmico humano 2), HER-3 (factor de crecimiento epidérmico humano 3), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, receptor de folato 1 (FOLR1), antígeno de superficie celular de trofoblasto humano 2 (Trop-2), antígeno del cáncer 12-5 (CA-12-5), antígeno leucocitario humano - relacionado con el antígeno D (HLA-DR), MUC-1 (mucina-1), antígeno A33, PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), tirosina quinasa 3 de tipo FMS (FLT-3), PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), PSCA (antígeno de

células madre de la próstata), receptor de transferrina, TNC (tenascina), anhidrasa carbónica IX (CA-IX) y/o péptidos unidos a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano.

En consecuencia, en el contexto de la presente invención, el receptor de unión al antígeno como se describe en la presente se une a un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G (de acuerdo con la numeración EU), es decir, un anticuerpo terapéutico capaz de unirse específicamente a un antígeno/marcador que se encuentra naturalmente en la superficie de las células tumorales seleccionado del grupo que consiste en FAP (proteína de activación de fibroblastos), CEA (antígeno carcinoembrionario), p95 (p95HER2), BCMA (antígeno de maduración de linfocitos B) EpCAM (molécula de adhesión a la célula epitelial), MSLN (mesotelina) MCSP (proteoglucano de sulfato de condroitina de melanoma), HER-1 (factor de crecimiento epidérmico humano 1), HER-2 (factor de crecimiento epidérmico humano 2), HER-3 (factor de crecimiento epidérmico humano 3), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, receptor de folato 1 (FOLR1), antígeno de superficie celular de trofoblasto humano 2 (Trop-2), antígeno del cáncer 12-5 (CA-12-5), antígeno leucocitario humano - relacionado con el antígeno D (HLA-DR), MUC-1 (mucina-1), antígeno A33, PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), tirosina quinasa 3 de tipo FMS (FLT-3), PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), PSCA (antígeno de células madre de la próstata), receptor de transferrina, TNC (tenascina), anhidrasa carbónica IX (CA-IX) y/o péptidos unidos a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano.

Las secuencias de los miembros (humanos) del antígeno A33, BCMA (antígeno de maduración de linfocitos B), antígeno del cáncer 12-5 (CA-12-5), anhidrasa carbónica IX (CA-IX), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CEA (antígeno carcinoembrionario), EpCAM (molécula de adhesión a la célula epitelial), FAP (proteína de activación de fibroblastos), tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT-3), receptor de folato 1 (FOLR1), HER-1 (factor de crecimiento epidérmico humano 1), HER-2 (factor de crecimiento epidérmico humano 2), HER-3 (factor de crecimiento epidérmico humano 3), antígeno leucocitario humano - relacionado con el antígeno D (HLA-DR), MSLN (mesotelina), MCSP (proteoglucano de sulfato de condroitina de melanoma), MUC-1 (mucina-1), PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata) PSCA (antígeno de células madre de la próstata), p95 (p95HER2), receptor de transferrina, TNC (tenascina), antígeno de superficie celular de trofoblasto humano 2 (Trop-2) están disponibles en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot y se pueden recuperar en <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed%3Ayes>. Estas secuencias (de proteínas) también se refieren a las secuencias modificadas

anotadas. La presente invención también proporciona técnicas y métodos en donde se usan secuencias homólogas, y también variantes genéticas alélicas y similares de las secuencias concisas proporcionadas en la presente. Preferentemente, se usan tales variantes y similares de las secuencias concisas de la presente. Preferentemente, tales variantes son variantes genéticas. La persona del oficio de nivel medio puede deducir fácilmente la región de codificación pertinente de estas secuencias (proteicas) en estas entradas del banco de datos, que también pueden comprender la entrada de ADN genómico, así como de ARNm/ADNc. Las secuencias de la FAP (proteína de activación de fibroblastos) (humana) pueden obtenerse de la entrada Q12884 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 168, versión de secuencia 5); las secuencias de CEA (antígeno carcinoembrionario) (humano) pueden obtenerse de la entrada P06731 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 171, versión de secuencia 3); las secuencias de EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales) (humana) pueden obtenerse de la entrada P16422 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 117, versión de secuencia 2); las secuencias de MSLN (mesotelina) (humana) pueden obtenerse del número de entrada de UniProt Q13421 (versión número 132; versión de secuencia 2); las secuencias de la tirosina quinasa 3 de tipo FMS (FLT-3) (humana) pueden obtenerse de la entrada P36888 (número de acceso citable primario) o Q13414 (número de acceso secundario) de la base de datos Swiss-Prot con la versión número 165 y la versión de secuencia 2; las secuencias de MCSP (proteoglucano de sulfato de condroitina de melanoma) (humano) pueden obtenerse del número de entrada Q6UVK1 de UniProt (versión número 118; versión de secuencia 2); las secuencias del receptor de folato 1 (FOLR1) (humano) pueden obtenerse del número de entrada P15328 de UniProt (número de acceso citable primario) o Q53EW2 (número de acceso secundario) con la versión número 153 y la versión de secuencia 3; las secuencias del antígeno 2 de la superficie celular del trofoblasto (Trop-2) (humano) pueden obtenerse del número de entrada de UniProt P09758 (número de acceso citable primario) o Q15658 (número de acceso secundario) con el número de versión 172 y la versión de secuencia 3; las secuencias del PSCA (antígeno de células madre de la próstata) (humano) pueden obtenerse del número de entrada de UniProt O43653 (número de acceso citable primario) o Q6UW92 (número de acceso secundario) con el número de versión 134 y la versión de secuencia 1; las secuencias de HER-1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico) (humano) pueden obtenerse de la entrada P00533 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 177, versión de secuencia 2); las secuencias de HER-2 (receptor tirosina-proteína quinasa erbB-2) (humano) pueden obtenerse de la entrada P04626 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 161, versión de secuencia 1); las

secuencias de HER-3 (receptor tirosina-proteína quinasa erbB-3) (humano) pueden obtenerse de la entrada P21860 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 140, versión de secuencia 1); las secuencias de CD20 (antígeno de linfocito B CD20) (humano) pueden obtenerse de la entrada P11836 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 117, versión de secuencia 1); las secuencias de CD22 (antígeno de linfocito B CD22) (humano) pueden obtenerse de la entrada P20273 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 135, versión de secuencia 2); las secuencias de CD33 (antígeno de linfocito B CD33) (humano) pueden obtenerse de la entrada P20138 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 129, versión de secuencia 2); las secuencias de CA-12-5 (mucina 16) (humana) pueden obtenerse de la entrada Q8WXI7 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 66, versión de secuencia 2); las secuencias de HLA-DR (humano) pueden obtenerse de la entrada Q29900 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 59, versión de secuencia 1); las secuencias de MUC-1 (mucina-1) (humana) pueden obtenerse de la entrada P15941 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 135, versión de secuencia 3); las secuencias de A33 (antígeno A33 de la superficie celular) (humano) pueden obtenerse de la entrada Q99795 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 104, versión de secuencia 1); las secuencias de PSMA (glutamato carboxipeptidasa 2) (humana) pueden obtenerse de la entrada Q04609 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 133, versión de secuencia 1), las secuencias del receptor de la transferrina (humano) pueden obtenerse de las entradas Q9UP52 (versión de entrada 99, versión de secuencia 1) y P02786 (versión de entrada 152, versión de secuencia 2) de la base de datos Swiss-Prot; la secuencia de TNC (tenascina) (humana) puede obtenerse de la entrada P24821 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 141, versión de secuencia 3); o las secuencias de CA-IX (anhidrasa carbónica IX) (humana) pueden obtenerse de la entrada Q16790 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 115, versión de secuencia 2). En una forma de realización preferida, el antígeno de célula diana se selecciona del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP), antígeno carcinoembrionario (CEA), mesotelina (MSLN), CD20, receptor de folato 1 (FOLR1) y tenascina (TNC).

Los anticuerpos capaces de unirse específicamente a cualquiera de los antígenos de células diana mencionados anteriormente pueden generarse usando métodos bien conocidos en el estado de la técnica, tales como la inmunización de un sistema inmunitario de mamíferos y/o la expresión de fagos usando colecciones recombinantes.

Los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención comprenden un dominio Fc que comprende la mutación P329G (de acuerdo con la numeración EU). La mutación

P329G redujo la unión del receptor Fc y/o la función efectora y puede usarse en combinación con otras mutaciones Fc que afectan la unión y/o la función efectora. En consecuencia, en otras formas de realización, el dominio Fc mutado de los anticuerpos presenta una afinidad de unión reducida a un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa. En una forma de realización similar, el dominio Fc mutado (o el anticuerpo que comprende dicho dominio Fc mutado) presenta menos de 50 %, preferentemente, menos de 20 %, con mayor preferencia, menos de 10 % y, con máxima preferencia, menos de 5 % de la afinidad de unión a un receptor Fc en comparación con un dominio Fc nativo de IgG₁ (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc nativo de IgG₁), y/o menos de 50 %, preferentemente, menos de 20 %, con mayor preferencia, menos de 10 % y, con máxima preferencia, menos de 5 % de la función efectora, en comparación con un dominio Fc nativo de IgG₁ (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc nativo de IgG₁). En una forma de realización, el dominio Fc mutado (o el anticuerpo que comprende dicho dominio Fc mutado) no se une sustancialmente a un receptor Fc y/o induce una función efectora. En una forma de realización particular, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En una forma de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En una forma de realización, el receptor Fc es un receptor Fc de activación. En una forma de realización específica, el receptor Fc es un receptor Fcγ humano de activación, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, con máxima especificidad FcγRIIIa humano. En una forma de realización, la función efectora es una o más seleccionadas del grupo de CDC, ADCC, ADCP y secreción de citocinas. En una forma de realización particular, la función efectora es ADCC. En una forma de realización, el dominio Fc mutado presenta una afinidad de unión sustancialmente alterada al receptor Fc neonatal (FcRn), en comparación con un dominio Fc nativo de IgG₁. En una forma de realización, el anticuerpo que comprende el dominio Fc mutado presenta menos de 20 %, particularmente menos de 10 %, más en particular, menos de 5 % de la afinidad de unión a un receptor Fc en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. En una forma de realización particular, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En algunas formas de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En algunas formas de realización, el receptor Fc es un receptor Fc de activación. En una forma de realización específica, el receptor Fc es un receptor Fcγ humano de activación, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, con máxima especificidad FcγRIIIa humano. Preferentemente, la unión a cada uno de estos receptores está reducida. En algunas formas de realización, también se reduce la afinidad de unión a un componente del complemento, específicamente la afinidad de unión a C1q.

En algunas formas de realización, el dominio Fc del anticuerpo está mutado para tener una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no mutado. La función efectora reducida puede incluir, entre otros, uno o más de los siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, absorción reducida de antígeno mediada por el complejo inmunitario por parte de células que presentan antígenos, unión a células NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, apoptosis que induce señalización directa reducida, reticulación de anticuerpos unidos a la diana reducida, maduración celular dendrítica reducida, o cebado de linfocitos T reducido. En una forma de realización, la función efectora reducida es una o más seleccionadas del grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida y secreción reducida de citocinas. En una forma de realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En una forma de realización, la ADCC reducida es menos de 20 % de la ADCC inducida por un dominio Fc no modificado mediante ingeniería genética (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc no modificado mediante ingeniería genética).

En una forma de realización, la mutación de aminoácido que reduce la afinidad de unión del dominio Fc con un receptor Fc y/o la función efectora es una sustitución de aminoácido. En una forma de realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo de E233, L234, L235, N297 y P331. En una forma de realización más específica, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones L234 y/o L235. En algunas formas de realización, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A. En una forma de realización tal, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana. En una forma de realización más específica, la sustitución de aminoácidos adicional es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En una forma de realización preferida, el dominio Fc comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G ("P329G LALA") de acuerdo con la numeración EU. En una forma de realización tal, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana. La combinación "P329G LALA" de sustituciones de aminoácidos suprime casi por completo la unión al receptor Fcγ (así como al complemento) de un dominio Fc de IgG₁ humana, como se describe en la publicación PCT N.º WO 2012/130831, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. El documento WO 2012/130831 también describe métodos para preparar tales dominios Fc mutantes y métodos para determinar sus propiedades, tales como la unión al receptor Fc

o las funciones efectoras.

En algunas formas de realización, se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En una de estas formas de realización, el dominio Fc comprende una mutación de aminoácido en la posición N297, en particular una mutación de aminoácido que sustituye asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en la presente y en la publicación PCT N.º WO 2012/130831, los dominios Fc con reducción de la unión al receptor Fc y/o de la función efectora también incluyen aquellos con mutación de uno o más de los residuos del dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente estadounidense N.º 6.737.056). Dichos mutantes Fc incluyen los mutantes Fc con mutaciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270 y 297, que incluyen el mutante Fc denominado "DANA" con mutación de los residuos 265 y 297 por alanina (patente estadounidense N.º 7.332.581).

Se pueden preparar dominios Fc mutantes mediante eliminación, sustitución, inserción o modificación de aminoácido con métodos genéticos o químicos conocidos en el estado de la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir la mutagénesis específica del sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios correctos de nucleótidos pueden verificarse, por ejemplo, mediante secuenciación.

La unión a receptores Fc puede determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante ELISA o mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando instrumentos estándares, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores Fc, tales como los que se pueden obtener mediante expresión recombinante. Alternativamente, puede evaluarse la afinidad de unión de los dominios Fc o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un dominio Fc con los receptores Fc mediante el uso de líneas celulares conocidas por expresar receptores Fc particulares, tales como las células NK humanas que expresan el receptor FcγIIIa.

Se puede medir la función efectora de un dominio Fc, o un anticuerpo que comprende un dominio Fc, mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Se describen otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente estadounidense N.º 5.500.362; Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); la patente estadounidense N.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Alternativamente, pueden emplearse métodos de ensayo no radioactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para

tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células *natural killer* (NK). De manera alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se divulga en Clynes *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunas formas de realización, la unión del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q, está reducida. En consecuencia, en algunas formas de realización en donde el dominio Fc está diseñado por ingeniería genética para tener una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye una CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si el anticuerpo es capaz de unirse a C1q y, por lo tanto, tiene actividad CDC. Ver, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Kits

Otro aspecto de la presente invención son kits que comprenden o consisten en un ácido nucleico que codifica un receptor de unión al antígeno de la invención y/o células, preferentemente linfocitos T para transducción/transducidos con receptores de unión al antígeno de la invención y, opcionalmente, anticuerpos que comprenden un dominio Fc mutado, en donde el receptor de unión al antígeno es capaz de unirse específicamente al dominio Fc mutado.

En consecuencia, se proporciona un kit que comprende

- (A) un linfocito T transducido capaz de expresar un receptor de unión al antígeno de la invención; y
- (B) un anticuerpo que se une a un antígeno de célula diana y que comprende un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU.

Además, se proporciona un kit que comprende

- (A) un polinucleótido aislado y/o un vector que codifica un receptor de unión al antígeno de la invención; y
- (B) un anticuerpo que se une a un antígeno de célula diana y que comprende un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU.

Los kits de la presente invención pueden comprender linfocitos T transducidos, polinucleótidos aislados y/o vectores y uno o más anticuerpos que comprenden un

dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU. En formas de realización particulares, el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico, por ejemplo, un anticuerpo específico para tumores como se describió anteriormente en la presente. Los antígenos específicos de los tumores son conocidos en el estado de la técnica y se describieron anteriormente en la presente. En el contexto de la presente invención, el anticuerpo se administra antes, en simultáneo con o después de la administración del linfocito T transducido que expresa un receptor de unión al antígeno de la invención. Los kits de acuerdo con la presente invención comprenden polinucleótidos/vectores o linfocitos T transducidos para generar linfocitos T transducidos. En este contexto, los linfocitos T transducidos son linfocitos T universales, ya que no son específicos de un tumor determinado, sino que pueden dirigirse a cualquier tumor mediante el uso de un anticuerpo terapéutico que comprenda el dominio Fc mutado. En la presente se proporcionan ejemplos de anticuerpos que comprenden un dominio Fc que comprende la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU (por ejemplo, SEQ ID No: 102-115). Sin embargo, cualquier anticuerpo que comprenda un dominio Fc que comprenda la mutación de aminoácido P329G de acuerdo con la numeración EU puede usarse de acuerdo con la invención e incluirse en los kits proporcionados en la presente.

En una forma de realización específica, el anticuerpo que comprende la región Fc mutada es capaz de unirse específicamente a CD20 y comprende la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO:102, y la secuencia de la cadena liviana de SEQ ID NO:103. En una forma de realización, el anticuerpo que comprende la región Fc mutada es capaz de unirse específicamente a FAP y comprende la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO:104, y la secuencia de la cadena liviana de SEQ ID NO:105. En una forma de realización, el anticuerpo que comprende la región Fc mutada es capaz de unirse específicamente a CEA y comprende la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO:106 y la secuencia de la cadena liviana de SEQ ID NO:107, la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO:108 y la secuencia de la cadena liviana de SEQ ID NO:109, la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO:110 y la secuencia de la cadena liviana de SEQ ID NO:111, o la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO:112 y la secuencia de la cadena liviana de SEQ ID NO:113. En otras formas de realización, el anticuerpo que comprende la región Fc mutada es capaz de unirse específicamente a la tenascina (TNC) y comprende la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO:114 y la secuencia de la cadena liviana de SEQ ID NO:115.

En una forma de realización de la presente invención, se proporciona un kit que comprende un linfocito T transducido capaz de expresar la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO:7 ("VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD" o, alternatively, el kit comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (por ejemplo, el kit comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:20), combinado con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:102 y una cadena liviana de SEQ ID NO:103. Este kit puede usarse para el tratamiento del cáncer positivo para CD20.

En otra forma de realización de la presente invención, se proporciona un kit que comprende un linfocito T transducido capaz de expresar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 ("VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD" o, alternatively, el kit comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (por ejemplo, el kit comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:20), combinado con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:104 y una cadena liviana de SEQ ID NO:105. Este kit puede usarse para el tratamiento del cáncer positivo para FAP.

En otra forma de realización de la presente invención, se proporciona un kit que comprende un linfocito T transducido capaz de expresar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 ("VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD" o, alternatively, el kit comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (por ejemplo, el kit comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:20), combinado con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:106 y una cadena liviana de SEQ ID NO:107. De manera alternativa, se proporciona un kit que comprende un linfocito T transducido capaz de expresar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 ("VH3VL1-CD28ATD-CD137CSD-CD3zSSD" o, alternatively, el kit comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (por ejemplo, el kit comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:20), combinado con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:108 y una cadena liviana de SEQ ID NO:109. Este kit puede usarse para el tratamiento del cáncer positivo para FAP. De manera alternativa, se proporciona un kit que comprende un linfocito T transducido capaz de expresar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 ("VH3VL1-CD28ATD-CD137CSD-CD3zSSD" o, alternatively, el kit comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (por ejemplo, el kit comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:20), combinado con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:110 y una cadena liviana de SEQ ID NO:111. En otra forma de realización, se proporciona un kit que comprende un linfocito T transducido capaz de expresar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO:7 (“VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD” o, alternatively, el kit comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (por ejemplo, el kit comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:20), combinado con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:112 y una cadena liviana de SEQ ID NO:113. Estos kits pueden usarse para el tratamiento del cáncer positivo para CEA.

En otra forma de realización de la presente invención, se proporciona un kit que comprende un linfocito T transducido capaz de expresar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (“VH3VL1-CD8ATD-CD137CSD-CD3zSSD” o, alternatively, el kit comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (por ejemplo, el kit comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:20), combinado con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO:114 y una cadena liviana de SEQ ID NO:115. Este kit puede usarse para el tratamiento del cáncer positivo para TNC.

Además, las partes del kit de la invención pueden envasarse individualmente en viales o frascos o en combinación en contenedores o unidades multicontenedor. De manera adicional, el kit de la presente invención puede comprender un sistema de incubación de células en bolsa (cerrada) donde las células del paciente, preferentemente los linfocitos T descritos en la presente, pueden transducirse con receptores de unión al antígeno de la invención e incubarse en condiciones GMP (buenas prácticas de fabricación, tal como se describen en las directrices de buenas prácticas de fabricación publicadas por la Comisión Europea en http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/index_en.htm). Además, el kit de la presente invención comprende un sistema de incubación de células en bolsa (cerrada) donde los linfocitos T aislados/obtenidos de los pacientes pueden ser transducidos con receptores de unión al antígeno de la invención e incubados según GMP. Además, en el contexto de la presente invención, el kit puede comprender también un vector que codifica los receptores de unión al antígeno como se describen en la presente. El kit de la presente invención puede usarse ventajosamente, entre otras cosas, para llevar a cabo el método de la invención y podría emplearse en una variedad de aplicaciones a las que se hace referencia en la presente, por ejemplo, como herramientas de investigación o herramientas médicas. La fabricación de los kits sigue preferentemente métodos estándares conocidos por la persona del oficio de nivel medio.

En este contexto, las células derivadas del paciente, preferentemente linfocitos T, pueden transducirse con un receptor de unión al antígeno de la invención capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado como se describe en la presente, usando el kit descrito anteriormente. El dominio extracelular que comprende una porción de unión al

antígeno capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado no se encuentra naturalmente en los linfocitos T o sobre estos. En consecuencia, las células derivadas del paciente transducidas con los kits de la invención adquirirán la capacidad de unirse específicamente a un dominio Fc mutado de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico, y serán capaces de inducir la eliminación/lisis de las células diana a través de la interacción con un anticuerpo terapéutico que comprende el dominio Fc mutado, en donde el anticuerpo terapéutico es capaz de unirse a un antígeno específico del tumor que se encuentra naturalmente (que se expresa endógenamente) en la superficie de una célula tumoral. La unión del dominio extracelular del receptor de unión al antígeno descrito en la presente activa ese linfocito T y lo pone en contacto físico con la célula tumoral a través del anticuerpo terapéutico que comprende el dominio Fc mutado. Los linfocitos T no transducidos o endógenos (por ejemplo, los linfocitos T CD8+) no pueden unirse al dominio Fc mutado del anticuerpo terapéutico que comprende el dominio Fc mutado. Los linfocitos T transducidos que expresan el receptor de unión al antígeno que comprende el dominio extracelular capaz de unirse específicamente a un dominio Fc mutado no se ven afectados por un anticuerpo terapéutico que no comprende las mutaciones en el dominio Fc como se describe en la presente. En consecuencia, los linfocitos T que expresan la molécula receptora de unión al antígeno inventiva tienen la capacidad de lisar células diana en presencia de un anticuerpo que comprende las mutaciones en el dominio Fc como se describe en la presente *in vivo* y/o *in vitro*. Las células diana correspondientes comprenden células que expresan una molécula de superficie, es decir, un antígeno específico del tumor que se encuentra naturalmente en la superficie de una célula tumoral, que es reconocido por al menos uno, preferentemente dos, dominios de unión del anticuerpo terapéutico como se describe en la presente. Tales moléculas de superficie están caracterizadas más adelante en la presente.

La lisis de la célula diana puede ser detectada mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. En consecuencia, tales métodos comprenden, entre otros, ensayos fisiológicos *in vitro*. Tales ensayos fisiológicos pueden monitorizar la muerte celular, por ejemplo, por pérdida de la integridad de la membrana celular (por ejemplo, ensayo de yoduro de propidio basado en FACS, ensayo de afluencia de azul tripán, ensayos fotométricos de liberación de enzimas (LDH), ensayo radiométrico de liberación de ⁵¹Cr, ensayo fluorométrico de liberación de europio y ensayos de liberación de CalceinAM). Otros ensayos comprenden la monitorización de la viabilidad celular, por ejemplo, mediante ensayos fotométricos de MTT, XTT, WST-1 y alamarBlue, ensayo radiométrico de incorporación de ³H-Thd, ensayo clonogénico que mide la actividad de división celular y ensayo fluorométrico de Rodamina123 que mide el gradiente transmembranario

mitocondrial. Además, la apoptosis puede controlarse, por ejemplo, mediante un ensayo de exposición a la fosfatidilserina basado en FACS, un ensayo TUNEL basado en ELISA, un ensayo de actividad de caspasas (fotométrico, fluorométrico o basado en ELISA) o el análisis de los cambios en la morfología de las células (encogimiento, formación de protuberancias en la membrana).

Uso terapéutico y métodos de tratamiento

Las moléculas o los constructos (por ejemplo, receptores de unión al antígeno, linfocitos T transducidos y kits) proporcionados en la presente son particularmente útiles en el ámbito médico, en particular para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, un tumor puede tratarse con un linfocito T transducido que exprese un receptor de unión al antígeno de la presente invención junto con un anticuerpo terapéutico que se una a un antígeno diana en la célula tumoral y que comprenda un dominio Fc mutado (es decir, un dominio Fc que comprende la mutación P329G de acuerdo con la numeración EU). En consecuencia, en ciertas formas de realización, el receptor de unión al antígeno, el linfocito T transducido o el kit se usan en el tratamiento del cáncer, en particular del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y del cáncer de la sangre.

La especificidad tumoral del tratamiento la proporciona el anticuerpo terapéutico que se une a un antígeno de la célula diana, en donde el anticuerpo se administra antes, en simultáneo con o después de la administración del linfocito T transducido que expresa un receptor de unión al antígeno de la invención. En este contexto, los linfocitos T transducidos son linfocitos T universales, ya que no son específicos para un tumor determinado, sino que pueden dirigirse a cualquier tumor según la especificidad del anticuerpo terapéutico usado de acuerdo con la invención.

El cáncer puede ser cáncer/carcinoma de origen epitelial, endotelial o mesotelial o cáncer de la sangre. En una forma de realización, el cáncer/carcinoma se selecciona del grupo que consiste en cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer oral, cáncer gástrico, cáncer cervical, linfoma de linfocitos B y T, leucemia mieloide, cáncer de ovario, leucemia, leucemia linfática, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel (melanoma), tipos de cáncer del tracto genitourinario, por ejemplo, cáncer de testículo, cáncer de ovario, cáncer endotelial, cáncer de cuello uterino y cáncer de riñón, cáncer de la vía biliar, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales y cáncer de la glándula tiroides u otras enfermedades tumorales como tumores hematológicos, gliomas, sarcomas u osteosarcomas.

Por ejemplo, las enfermedades tumorales y/o los linfomas pueden tratarse con un constructo específico dirigido contra estas indicaciones médicas. Por ejemplo, el cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas, el cáncer colangiocelular, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de piel y/o el cáncer oral pueden tratarse con un anticuerpo dirigido contra la EpCAM (humana) (como antígeno específico del tumor que se encuentra naturalmente en la superficie de una célula tumoral).

El cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas, el cáncer colangiocelular, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de piel y/o el cáncer oral pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra HER1, preferentemente HER1 humano. Además, el cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas, el cáncer colangiocelular, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de piel, el glioblastoma y/o el cáncer oral pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra MCSP, preferentemente MCSP humano. El cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas, el cáncer colangiocelular, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de piel, el glioblastoma y/o el cáncer oral pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra FOLR1, preferentemente FOLR1 humano. El cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas, el cáncer colangiocelular, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de piel, el glioblastoma y/o el cáncer oral pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra Trop-2, preferentemente Trop-2 humano. El cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas, el cáncer colangiocelular, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de piel, el glioblastoma y/o el cáncer oral pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra PSCA, preferentemente PSCA humano. El cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas, el cáncer colangiocelular, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de piel, el glioblastoma y/o el cáncer oral pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra EGFRvIII, preferentemente EGFRvIII humano. El cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas, el cáncer colangiocelular, el

cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de piel, el glioblastoma y/o el cáncer oral pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra MSLN, preferentemente MSLN humana. El cáncer gástrico, el cáncer de mama y/o el cáncer cervical pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra HER2, preferentemente HER2 humano. El cáncer gástrico y/o el cáncer de pulmón pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra HER3, preferentemente HER3 humano. El linfoma de linfocitos B y/o el linfoma de linfocitos T pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra CD20, preferentemente CD20 humano. El linfoma de linfocitos B y/o el linfoma de linfocitos T pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra CD22, preferentemente CD22 humano. La leucemia mieloide puede tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra CD33, preferentemente CD33 humano. El cáncer de ovario, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama y/o el cáncer gastrointestinal pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra CA12-5, preferentemente CA12-5 humano. El cáncer gastrointestinal, la leucemia y/o el carcinoma nasofaríngeo pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra HLA-DR, preferentemente HLA-DR humano. El cáncer de colon, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de pulmón y/o el cáncer de páncreas pueden ser con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra MUC-1, preferentemente MUC-1 humano. El cáncer de colon puede tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra A33, preferentemente A33 humano. El cáncer de próstata puede tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra PSMA,

preferentemente PSMA humano. El cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas, el cáncer colangiocelular, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de piel y/o el cáncer oral pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de una terapéutica dirigida contra el receptor de transferrina, preferentemente el receptor de transferencia humano. El cáncer de páncreas, el cáncer de pulmón y/o el cáncer de mama pueden tratarse con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra el receptor de transferrina, preferentemente el receptor de transferencia humano. El cáncer renal puede ser con un linfocito T transducido de la presente invención administrado antes, en simultáneo con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico dirigido contra CA-IX, preferentemente CA-IX humano.

La invención también se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad, una enfermedad maligna como el cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y/o el cáncer de sangre. En el contexto de la presente invención, dicho sujeto es un ser humano.

En el contexto de la presente invención, un método particular para el tratamiento de una enfermedad comprende las etapas de

- (a) aislar linfocitos T, preferentemente CD8+, de un sujeto;
- (b) transducir dichos linfocitos T aislados, preferentemente linfocitos T CD8+, con un receptor de unión al antígeno como se describe en la presente; y
- (c) administrar los linfocitos T transducidos, preferentemente linfocitos T CD8+, a dicho sujeto.

En el contexto de la presente invención, dichos linfocitos T transducidos, preferentemente linfocitos T CD8+, y/o anticuerpos terapéuticos se coadministran a dicho sujeto mediante infusión intravenosa.

Asimismo, en el contexto de la presente invención, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad que comprende las etapas de

- (a) aislar linfocitos T, preferentemente CD8+, de un sujeto;
- (b) transducir dichos linfocitos T aislados, preferentemente linfocitos T CD8+, con un receptor de unión al antígeno como se describe en la presente;
- (c) cotransducir, de manera opcional, dichos linfocitos T aislados, preferentemente linfocitos T CD8+, con un receptor de linfocitos T;
- (d) expandir los linfocitos T, preferentemente los linfocitos T CD8+, mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28; y
- (e) administrar los linfocitos T transducidos, preferentemente linfocitos T CD8+, a

dicho sujeto.

La etapa (d) mencionada anteriormente (referida a la etapa de expansión de los linfocitos T, tales como TIL, mediante anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28) también puede realizarse en presencia de citocinas (estimulantes) como la interleucina-2 y/o la interleucina-15 (IL-15). En el contexto de la presente invención, la etapa (d) mencionada anteriormente (referida a la etapa de expansión de los linfocitos T, tales como TIL, mediante anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28) también puede realizarse en presencia de interleucina-12 (IL-12), interleucina-7 (IL-7) y/o interleucina-21 (IL-21).

Además, el método para el tratamiento comprende la administración del anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención. Dicho anticuerpo puede administrarse antes, en simultáneo con o después de la administración de los linfocitos T transducidos. En el contexto de la presente invención, la administración de los linfocitos T transducidos se realizará mediante infusión intravenosa. En el contexto de la presente invención, los linfocitos T transducidos se aíslan/obtienen del sujeto por tratar.

La invención prevé además los protocolos de coadministración con otros compuestos, por ejemplo, moléculas capaces de proporcionar una señal de activación para las células efectoras inmunitarias, para la proliferación celular o para la estimulación celular. Dicha molécula puede ser, por ejemplo, una señal de activación primaria adicional para los linfocitos T (por ejemplo, una molécula coestimuladora adicional: moléculas de la familia B7, Ox40L, 4.1 BBL, CD40L, anti-CTLA-4, anti-PD-1), u otra citocina, la interleucina (por ejemplo, IL-2).

La composición de la invención, como se describió anteriormente, puede ser también una composición de diagnóstico que comprende además, opcionalmente, medios y métodos de detección.

Composiciones

Asimismo, la invención proporciona composiciones (medicamentos) que comprenden moléculas de anticuerpo con dominios Fc mutados, y/o linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión al antígeno de la invención, y/o moléculas de ácido nucleico y vectores que codifican los receptores de unión al antígeno de acuerdo con la invención. Además, la invención proporciona kits que comprenden una o más de dichas composiciones. En el contexto de la presente invención, la composición es una composición farmacéutica que también comprende, opcionalmente, formulaciones adecuadas de portador, estabilizantes y/o excipientes. En consecuencia, en el contexto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica (medicamento) que comprende una molécula de anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado como

se define en la presente que se debe administrar en combinación con un linfocito T transducido que comprende un receptor de unión al antígeno como se describe en la presente y/o una composición que comprende dicho linfocito T transducido, en donde dicha molécula de anticuerpo se debe administrar antes, en simultáneo con o después de la administración de linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión al antígeno de la invención.

El uso de la expresión “en combinación” no restringe el orden en que los componentes del régimen de tratamiento se deben administrar al sujeto. En consecuencia, la composición farmacéutica/el medicamento descritos en la presente abarcan la administración de un anticuerpo como se define en la presente antes, en simultáneo con o después de la administración de linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión al antígeno de la presente invención. Además, “en combinación”, como se usa en la presente, no restringe el momento entre la administración de un anticuerpo como se definió anteriormente en la presente y los linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión al antígeno como se define en la presente. Por lo tanto, cuando los dos componentes no se administran de manera simultánea/concurrente, las administraciones pueden estar separadas por 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas o 72 horas o por cualquier diferencia de tiempo adecuada determinada fácilmente por una persona del oficio de nivel medio y/o descrita en la presente.

En el contexto de la presente invención, la expresión “en combinación” también abarca la situación en donde el anticuerpo como se define en la presente y los linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión al antígeno de acuerdo con la invención se preincuban juntos antes de la administración al sujeto. Por lo tanto, los dos componentes se pueden preincubar antes de la administración, por ejemplo, durante 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos o 1 hora, o durante cualquier lapso de tiempo adecuado determinado fácilmente por una persona del oficio de nivel medio. En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un régimen de tratamiento, en donde el anticuerpo como se define en la presente y los linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión al antígeno como se define en la presente, se deben administrar de manera simultánea/concurrente. En el contexto de la presente invención, el anticuerpo como se define en la presente se puede administrar una vez que se administraron los linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión al antígeno.

Además, “en combinación”, como se usa en la presente, no restringe los regímenes de tratamiento divulgados a la administración de un anticuerpo como se define en la

presente y linfocitos T transducidos, preferentemente, linfocitos T CD8+, que comprenden un receptor de unión al antígeno de la invención en secuencia inmediata (es decir, la administración de uno de los dos componentes, y luego (después de un determinado intervalo de tiempo), la administración del otro sin la administración y/o práctica de cualquier otro protocolo de tratamiento en el medio. Por lo tanto, los presentes regímenes de tratamiento también abarcan la administración separada de una molécula de anticuerpo como se define en la presente y linfocitos T transducidos, preferentemente, linfocitos T CD8+, que comprenden un receptor de unión al antígeno de acuerdo con la invención, en donde las administraciones se separan mediante uno o más protocolos de tratamiento necesarios y/o adecuados para el tratamiento o la prevención de la enfermedad o un síntoma de esta. Algunos ejemplos de dichos protocolos de tratamiento intervinientes incluyen, entre otros, la administración de medicamentos para el dolor, la administración de productos quimioterapéuticos, el tratamiento quirúrgico de la enfermedad o de un síntoma de esta. En consecuencia, los regímenes de tratamiento como se divulgan en la presente abarcan la administración de un anticuerpo como se define en la presente y linfocitos T transducidos, preferentemente, linfocitos T CD8+, que comprenden un receptor de unión al antígeno como se define en la presente junto con ningún, uno o más de un protocolo de tratamiento adecuado para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, o un síntoma de esta, como se describe en la presente o como se conoce en el estado de la técnica.

Se prevé en particular que dichas composiciones farmacéuticas/medicamentos se administren a un paciente mediante infusión o inyección. En el contexto de la presente invención, los linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión al antígeno como se describe en la presente se administrarán a un paciente mediante infusión o inyección. La administración de las composiciones/medicamentos adecuados se puede efectuar de maneras diferentes, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica.

La composición farmacéutica/medicamento de la presente invención también puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas amortiguadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden tales portadores se pueden formular mediante métodos convencionales conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. Este régimen de dosis lo determinarán el médico tratante y factores clínicos. Como se conoce en el campo de la medicina, las dosis para cualquier

paciente dependen de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular por administrar, el sexo, el momento y la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se administran de manera concurrente. Generalmente, el régimen como administración regular de la composición farmacéutica debe estar en el rango de 1 μg a 5 g de unidades por día. No obstante, una dosis de mayor preferencia para infusión continua puede estar en el rango de 0,01 μg a 2 mg, preferentemente, 0,01 μg a 1 mg, con mayor preferencia, 0,01 μg a 100 μg , aun con mayor preferencia, 0,01 μg a 50 μg y, con máxima preferencia, 0,01 μg a 10 μg de unidades por kilogramo de peso corporal por hora. Las dosis particularmente preferidas se indican más adelante en la presente. El progreso puede monitorearse mediante evaluaciones periódicas. Las dosis variarán, pero una dosis preferida para administración intravenosa de ADN es de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula de ADN.

Las composiciones de la invención se pueden administrar de manera local o sistemática. En general, la administración será por vía parenteral, por ejemplo, intravenosa; los linfocitos T transducidos también se pueden administrar dirigidos al sitio diana, por ejemplo, mediante catéter a un sitio en una arteria. Los preparados para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Algunos ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medio amortiguado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como aquellos a base de dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender portadores proteínicos, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, preferentemente, de origen humano. Se prevé que la composición farmacéutica de la invención puede comprender, además de los constructos de anticuerpo proteínicos o moléculas de ácido nucleico o vectores que las codifican (como se describe en la presente invención), y/o células, otros agentes biológicamente activos, según el uso previsto de la composición farmacéutica. Tales agentes pueden ser fármacos que actúan sobre el sistema gastrointestinal, fármacos que actúan como citostáticos, fármacos que previenen la hiperuricemia, fármacos que inhiben reacciones

inmunitarias (por ejemplo, corticoesteroides), fármacos que actúan sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como moléculas coestimuladoras de linfocitos T o citocinas conocidas en el estado de la técnica.

La descripción y los ejemplos de la presente invención divulgan y abarcan estas y otras formas de realización. Más literatura con respecto a cualquiera de los anticuerpos, métodos, usos y compuestos que se usarán de acuerdo con la presente invención se puede obtener de bibliotecas y bases de datos públicas, usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, la base de datos pública "Medline" disponible en Internet se puede utilizar, por ejemplo, en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Otras bases de datos y URL, tales como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, <http://www.tigr.org/>, se conocen en el estado de la técnica y se pueden obtener también usando, por ejemplo, <http://www.lycos.com>.

Secuencias de ejemplo

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos CAR P329G VH3VL1 de ejemplo:

Definición de CDR de acuerdo con Kabat

Constructo	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VH3 CDR H1	RYWMN	1
VH3 CDR H2	EITPDSSTINYAPSLKG	2
VH3 CDR H3	PYDYGAWFAS	3
VL1 CDR L1	RSSTGAVTTSNYAN	4
VL1 CDR L2	GTNKRAP	5
VL1 CDR L3	ALWYSNHWV	6
Fusión VH3VL1- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSR YWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAP SLKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARPYDYGAWFASWGQGTlTVSSGGGGS GGGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLF TGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	7

	GGGSLKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTC GVLLLSLVITKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR	
VH3 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSR YWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAP SLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARPYDYGAWFASWGQGT LVT VSS	8
VL1 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWY SNHWVFGGGTKLTVL	9
VH3VL1 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSR YWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAP SLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARPYDYGAWFASWGQGT LVT VSSGGGGS GGGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLF TGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	10
CD8ATD	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	11
CD137CSD	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEEGGCEL	12
CD3zSSD	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQUALPPR	13
CD28ATD- CD137CSD- CD3zSSD	KPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLV ITKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQ	14

	LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
eGFP	VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGE GEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQE RTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNG IKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPV LLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVT AAGITLGMDELYK	15
Ligador (G4S) ⁴	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	16
Ligador G4S	GGGGS	17
Ligador T2A	GEGRGSLLTCGDVEENPGP	18
CD8stalk	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACD	19

Tabla 3: Secuencias de ADN CAR P329G VH3 x VL1 de ejemplo:

Construto	Secuencia de ADN	SEQ ID NO
Fusión VH3VL1- CD28ATD- CD137CSD- CD3zSSD	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGG CCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGG CCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGC GAGATCACCCCGACAGCAGCACCATCAAC TACGCCCCCAGCCTGAAGGGCAGGTTACC ATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGCCC TACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGG GGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAG CGGAGGGGGCGGAAGTGGTGGCGGGGGAA GCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCGG ATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGCCCAG	20

	CCTGACCGTGAGCCCCGGCGGCACCGTGA CCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCC GTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTG CAGGAGAAGCCCCGACCACCTGTTACCGGC CTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCACCCCCGCCAGGTTCAGCGGCAGCCT GCTGGGCGGCAAGGCCGCCCTGACCCTGA GCGGCGCCCAGCCCGAGGACGAGGCCGAG TACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACT GGGTGTTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACC GTCCTAGGAGGGGGCGGATCCTTGAAGCCC ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACA CCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCT GTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAG CGGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGG CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGG CGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTC TCCTGTCACTGGTTATCACCAAACGGGGCA GAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAG GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTG AAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAA CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGA CCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGA GGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAG GGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCT CGC	
VH3	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGG CCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGC	21

	TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGGTA CTGGATGAACTGGGTGAGGCAGG CCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGC GAGATCACCCCCGACAGCAGCACCATCAAC TACGCCCCCAGCCTGAAGGGCAGGTTACC ATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGCCC TACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGG GGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAG C	
VL1	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGCCCAGCCT GACCGTGAGCCCCGGCGGCACCGTGACCC TGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTG ACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAG GAGAAGCCCGACCACCTGTTACCGGCCTG ATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCCGG CACCCCCGCCAGGTTACGCGGCAGCCTGCT GGGCGGCAAGGCCGCCCTGACCCTGAGCG GCGCCCAGCCCGAGGACGAGGCCGAGTAC TACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGG GTGTTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTC CTA	22
VH3VL1 scFv	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGG CCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGGTA CTGGATGAACTGGGTGAGGCAGG CCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGC GAGATCACCCCCGACAGCAGCACCATCAAC TACGCCCCCAGCCTGAAGGGCAGGTTACC ATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGCCC TACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGG GGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAG CGGAGGGGGCGGAAGTGGTGGCGGGGGAA	23

	GCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCGG ATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGCCCAG CCTGACCGTGAGCCCCGGCGGCACCGTGA CCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCC GTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTG CAGGAGAAGCCCGACCACCTGTTACCGGC CTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCACCCCCGCCAGGTTACGCGGCAGCCT GCTGGGCGGCAAGGCCGCCCTGACCCTGA GCGGCGCCCAGCCCGAGGACGAGGCCGAG TACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACT GGGTGTTCTGGCGGCGGCACCAAGCTGACC GTCCTA	
CD8ATD	ATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACT TGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCA CC	24
CD137CSD	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATAT TCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAAC TACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGA ACTG	25
CD3zSSD	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTC TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC CTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC CCCCTCGC	26
CD28ATD- CD137CSD-	ATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACT TGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCA	27

CD3zSSD	CCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATAT ATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGC CGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGT GAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA GACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA AGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGA CGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAA GCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG CGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG GCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG CCCTGCCCCCTCGC	
Elemento T2A	TCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACA TGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCT AGG	28
eGFP	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGG GGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGG CGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTC CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACG GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCA CCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC CTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAG TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC TTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC AAGCTGGAGTACAACACAACAGCCACAAC GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCAC	29

	AACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC GACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGC GACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCAC TACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAA GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA	
Fusión VH3VL1- CD28ATD- CD137CSD- CD3zSSD GFP	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGG CCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGG CCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGC GAGATCACCCCCGACAGCAGCACCATCAAC TACGCCCCCAGCCTGAAGGGCAGGTTCAAC ATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGCCC TACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGG GGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAG CGGAGGGGGCGGAAGTGGTGGCGGGGGAA GCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCGG ATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGCCCAG CCTGACCGTGAGCCCCGGCGGCACCGTGA CCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCC GTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTG CAGGAGAAGCCCGACCACCTGTTACCGGC CTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCACCCCCGCCAGGTTACAGCGGCAGCCT GCTGGGCGGCAAGGCCGCCCTGACCCTGA GCGGCGCCCAGCCCGAGGACGAGGCCGAG TACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACT GGGTGTTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACC GTCCTAGGAGGGGGCGGATCCTTGAAGCCC ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACA CCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCT GTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAG	30

	CGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGG CGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTC TCCTGTCACTGGTTATCACCAAACGGGGCA GAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAG GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTG AAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAA CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGA CCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGA GGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAG GGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCT CGCGAATTCTCCGGAGAGGGCAGAGGAAGT CTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAAT CCCGGCCCTAGGGTGAGCAAGGGCGAGGA GCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGT CGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA GTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCG ATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGT TCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGC CCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCT ACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG ACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC CGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCG CACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGG CGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACAT CCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAA	
--	---	--

	CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAA GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGT GCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGC CCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCG ATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCG CCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC TGTACAAG	
--	---	--

Tabla 4: Secuencias de aminoácidos CAR P329G VL1VH3 de ejemplo:

Definición de CDR de acuerdo con Kabat

Constructo	Secuencia de aminoácidos	SEQ NO	ID
VH3 CDR H1	Ver tabla 2	1	
VH3 CDR H2	ver tabla 2	2	
VH3 CDR H3	ver tabla 2	3	
VL1 CDR L1	Ver tabla 2	4	
VL1 CDR L2	Ver tabla 2	5	
VL1 CDR L3	Ver tabla 2	6	
Fusión VL1VH3- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN HWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SRYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINY APSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARPYDYGAWFASWGQGTTLTVSSGGGGS LKPTTTPAPRPPT	31	
VH3 VH	Ver tabla 2	8	
VL1 VL	Ver tabla 2	9	
VL1VH3 scFv	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPAQAVVTQEPSLT VSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPD	32	

	HLFTGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLT VLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMNWVRQ APGKGLEWVGEITPDSSTINYAPSLKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPYDYGA WFASWGQGTLVTVSS	
CD8ATD	Ver tabla 2	11
CD137CSD	Ver tabla 2	12
CD3zSSD	Ver tabla 2	13
CD28ATD- CD137CDS- CD3zSSD	Ver tabla 2	14
eGFP	Ver tabla 2	15
Ligador (G4S)4	Ver tabla 2	16
Ligador G4S	Ver tabla 2	17
Ligador T2A	Ver tabla 2	18

Tabla 5: Secuencias de ADN CAR VL1VH3 P329G de ejemplo:

Construto	Secuencia de ADN	SEQ ID NO
Fusión VL1VH3 CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGCCCAGCCTGA CCGTGAGCCCCGGCGGCACCGTGACCCTGA CCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACCA CCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAA GCCCCGACCACCTGTTACCGGCCTGATCGGC GGCACCAACAAGAGGGCCCCCGGCACCCCC GCCAGGTTTCAGCGGCAGCCTGCTGGGCGGC AAGGCCGCCCTGACCCTGAGCGGCGCCCAG CCCGAGGACGAGGCCGAGTACTACTGCGCCC TGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTTCGGCGG CGGCACCAAGCTGACCGTCCTAGGAGGGGG CGGAAGTGGTGGCGGGGGAAGCGGCGGGGG TGGCAGCGGAGGGGGCGGATCTGAGGTGCA GCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCA	33

	GCCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGC CGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGGTAAGTGG ATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCAAG GGCCTGGAGTGGGTGGGCGAGATCACCCCC GACAGCAGCACCATCAACTACGCCCCCAGCC TGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAA CGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCAGGCCCTACGACTACGGCGCCTG GTTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT GACCGTGAGCAGCGGAGGGGGCGGATCCTT GAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACC ACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAG CCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGG CCAGCGGGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGG GGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTG GGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTT CTCCTGTCACTGGTTATCACCAAACGGGGCA GAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAA GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAG AAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCA GCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAG GAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAA GATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA CCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCA GGCCCTGCCCCCTCGC	
VH3	Ver tabla 3	20
VL1	Ver tabla 3	21
CD8ATD	Ver tabla 3	24

CD137CSD	Ver tabla 3	25
CD3zSSD	Ver tabla 3	26
CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD	Ver tabla 3	27
Elemento T2A	Ver tabla 3	28
eGFP	Ver tabla 3	29
Fusión VL1VH3- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD- eGFP	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGCCCAGCCTGA CCGTGAGCCCCGGCGGCACCGTGACCCTGA CCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACCA CCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAA GCCCCACCACCTGTTACCGGCCTGATCGGC GGCACCAACAAGAGGGCCCCCGGCACCCCC GCCAGGTTTCAGCGGCAGCCTGCTGGGCGGC AAGGCCGCCCTGACCCTGAGCGGCGCCCAG CCCGAGGACGAGGCCGAGTACTACTGCGCCC TGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTTCGGCGG CGGCACCAAGCTGACCGTCCTAGGAGGGGG CGGAAGTGGTGGCGGGGGAAGCGGCGGGGG TGGCAGCGGAGGGGGCGGATCTGAGGTGCA GCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCA GCCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGC CGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGGTACTGG ATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCAAG GGCCTGGAGTGGGTGGGCGAGATCACCCCC GACAGCAGCACCATCAACTACGCCCCCAGCC TGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAA CGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCAGGCCCTACGACTACGGCGCCTG GTTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT GACCGTGAGCAGCGGAGGGGGCGGATCCTT GAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACC ACCAACACCGGCGCCCCACCATCGCGTCGCAG CCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGG	34

	CCAGCGGGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGG GGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTG GGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTT CTCCTGTCACTGGTTATCACCAAACGGGGCA GAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAA GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAG AAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCA GCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAG GAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAA GATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG AAAGGCGAGCGCCGAGGGGGCAAGGGGCAC GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA CCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCA GGCCCTGCCCCCTCGCGAATTCTCCGGAGAG GGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACG TGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGTGAGCAA GGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCC CATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAAC GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCC TGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC CGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTG ACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACC CCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAG TCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGC GCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT GGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGC CACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA	
--	---	--

	GAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCG CCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGG CGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCAC TACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAG ACCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT GCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACT CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG	
--	---	--

Tabla 6: anticuerpos anti-P329G de ejemplo

Definición de CDR de acuerdo con Kabat

HulgG1 anti-P329G (M-1.7.24)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYTPSLKD	35
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS RYWMNWVRQAPGKGLEWIGEITPDSSTINY TPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMIKVRSEDAL YYCVRPYDYGAWFASWGQGTLVTVSA	36
VL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTT SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVP ARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALW YSNHWVFGGGTKLTVL	37
HC	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS RYWMNWVRQAPGKGLEWIGEITPDSSTINY TPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMIKVRSEDAL YYCVRPYDYGAWFASWGQGTLVTVSAASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP	38

	KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSP	
LC	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTT SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVP ARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALW YSNHWWFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	39
hulG1 anti-P329G (VH1VL1)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYTPSLKG	40
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWW	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD RYWMNWRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINY TPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGLTVTVSS	41
VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWWFGGGTKLTVL	9
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD RYWMNWRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINY TPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY	42

	SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSP	
LC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S	43
hulG1 anti-P329G (VH2VL1)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYAPSLKG	2
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD FYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTIN YAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLVTVSS	44
VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVL	9
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD FYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTIN YAPSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT	45

	AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSP	
LC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTT SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNKNYAASSYLSLT PEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S	43
hulG1 anti-P329G (VH3VL1)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYAPSLKG	2
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS RYWMNWRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINY APSLKGRFTISRDAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARPYDYGAWFASWGQGLTVTVSS	8
VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTT SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVL	9

HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS RYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINY APSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP	46
LC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S	43
hulG1 anti-P329G (VH4VL1)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYADSVKG	47
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFFS RYWMNWVRQAPGKGLEWVSEITPDSSTINY ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSS	48
VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT	9

	SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVL	
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD FS RYWMNWVRQAPGKGLEWVSEITPDSSTINY ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARPYDYGAWFASWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP	49
LC	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S	43
hulgG1 anti-P329G (VH1VL2)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYTPSLKG	40
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	4
LCDR2	GTNKRAP	5
LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD FS RYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINY	41

	TPSLKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGLVTVSS	
VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYANWFQQKPGQAFTGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAAALTLGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVL	50
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD RYWMNWRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINY TPSLKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSP	42
LC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYANWFQQKPGQAFTGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAAALTLGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S	51
hulG1 anti-P329G (VH1VL3)		
HCDR1	RYWMN	1
HCDR2	EITPDSSTINYTPSLKG	40
HCDR3	PYDYGAWFAS	3
LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	52
LCDR2	GTNKRAP	5

LCDR3	ALWYSNHWV	6
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD FS RYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTIN Y TPSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED T AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLLTVSS	41
VL	QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTT SNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVL	53
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD FS RYWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTIN Y TPSLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED T AVYYCVRPYDYGAWFASWGQGTLLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSP	42
LC	QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTT SNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S	54

Tabla 7: Variante de Fc de IgG1 P329G

hulIgG1	Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP	55
---------	----	----------------------------------	----

P329G	KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYT QKSLSLSP	
-------	--	--

Tabla 8

Constructo	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CD27 humano	ATGGCGCGCCCGCATCCGTGGTGGCTGTGC GTGCTGGGCACCCTGGTGGGCCTGAGCGC GACCCCGGCGCCGAAAAGCTGCCCGGAAC GCCATTATTGGGCGCAGGGCAAACCTGTGCT GCCAGATGTGCGAACCGGGCACCTTTCTGG TGAAAGATTGCGATCAGCATCGCAAAGCGG CGCAGTGCGATCCGTGCATTCCGGGCGTGA GCTTTAGCCCGGATCATCATACCCGCCCGC ATTGCGAAAAGCTGCCGCCATTGCAACAGCG GCCTGCTGGTGCGCAACTGCACCATTACCG CGAACGCGGAATGCGCGTGCCGCAACGGC TGGCAGTGCCGCGATAAAGAATGCACCGAA TGCGATCCGCTGCCGAACCCGAGCCTGACC GCGCGCAGCAGCCAGGCGCTGAGCCCGCA TCCGCGAGCCGACCCATCTGCCGTATGTGAG CGAAATGCTGGAAGCGCGCACCGCGGGCC ATATGCAGACCCTGGCGGATTTTCGCCAGC TGCCGGCGCGCACCCCTGAGCACCCATTGGC CGCCGCAGCGCAGCCTGTGCAGCAGCGATT TTATTGCGATTCTGGTGATTTTTCGCGCAT GTTTCTGGTGTTTACCCTGGCGGGCGCGCT GTTTCTGCATCAGCGCCGCAAATATCGCAG CAACAAAGGCGAAAAGCCCGGTGGAACCGGC GGAACCGTGCCATTATAGCTGCCCGCGCGA AGAAGAAGGCAGCACCATTCGATTTCAGGA AGATTATCGCAAACCGGAACCGGCGTGCGAG	56

	CCCG	
CD27 humano	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERH YWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQ CDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLL VRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPL PNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEAR TAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRS LCS SDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSN KGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYR KPEPACSP	57
CD27 murino	ATGGCGTGGCCGCCGCGTATTGGCTGTGC ATGCTGGGCACCCTGGTGGGCCTGAGCGC GACCCTGGCGCCGAACAGCTGCCCGGATAA ACATTATTGGACCGGCGGCGGCCTGTGCTG CCGCATGTGCGAACCGGGCACCTTTTTTGT GAAAGATTGCGAACAGGATCGCACCGCGGC GCAGTGCGATCCGTGCATTCCGGGCACCAG CTTTAGCCCGGATTATCATACCCGCCCGCAT TGCGAAAGCTGCCGCCATTGCAACAGCGGC TTTCTGATTGCAACTGCACCGTGACCGCGA ACGCGGAATGCAGCTGCAGCAAAAAGTGGC AGTGCCGCGATCAGGAATGCACCGAATGCG ATCCGCCGCTGAACCCGGCGCTGACCCGCC AGCCGAGCGAAACCCCGAGCCCGCAGCCG CCGCCGACCCATCTGCCGCATGGCACCGAA AAACCGAGCTGGCCGCTGCATCGCCAGCTG CCGAACAGCACCGTGTATAGCCAGCGCAGC AGCCATCGCCCGCTGTGCAGCAGCGATTGC ATTCGCATTTTTGTGACCTTTAGCAGCATGTT TCTGATTTTTGTGCTGGGCGCGATTCTGTTT TTTCATCAGCGCCGCAACCATGGCCCGAAC GAAGATCGCCAGGCGGTGCCGGAAGAACC GTGCCCCGTATAGCTGCCCGCGCGAAGAAGA AGGCAGCGCGATTCCGATTGAGGAAGATTA TCGCAAACCGGAACCGGCGTTTTATCCG	58
CD27 murino	MAWPPPYWLCMLGTLVGLSATLAPNSCPDKH	59

	YWTGGGLCCRMCEPGTFFVKDCEQDRATAQ CDPCIPGTSFSPDYHTRPHCESCRHCNSGFLI RNCTVTANAECSCSKNWQCRDQECTECDPP LNPALTRQPSETPSPQPPPTHLPHGTEKPSW PLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSSDCIRIFVTF SSMFLIFVLGAILFFHQRRNHGPNEDRQAVPE EPCPYSCPREEEGSAIPIQEDYRKPEPAFYP	
CD28 humano	ATGCTGCGCCTGCTGCTGGCGCTGAACCTG TTTCCGAGCATTTCAGGTGACCGGCAACAAAA TTCTGGTGAAACAGAGCCCGATGCTGGTGG CGTATGATAACGCGGTGAACCTGAGCTGCA AATATAGCTATAACCTGTTTAGCCGCGAATT TCGCGCGAGCCTGCATAAAGGCCTGGATAG CGCGGTGGAAGTGTGCGTGGTGTATGGCAA CTATAGCCAGCAGCTGCAGGTGTATAGCAA AACCGGCTTTAACTGCGATGGCAAACCTGGG CAACGAAAGCGTGACCTTTTATCTGCAGAAC CTGTATGTGAACCAGACCGATATTTATTTTGT CAAAATTGAAGTGATGTATCCGCCGCCGTAT CTGGATAACGAAAAAAGCAACGGCACCATTA TTCATGTGAAAGGCAAACATCTGTGCCCGAG CCCGCTGTTTCCGGGCCCGAGCAAACCGTT TTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGC TGGCGTGCTATAGCCTGCTGGTGACCGTGG CGTTTATTATTTTTTGGGTGCGCAGCAAACG CAGCCGCCTGCTGCATAGCGATTATATGAAC ATGACCCCGCGCCGCCCGGGCCCGACCCG CAAACATTATCAGCCGTATGCGCCGCCGCG CGATTTTGCGGCGTATCGCAGC	60
CD28 humano	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYD NAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEV CVVYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVT FYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSN GTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWWLVVVG VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMN TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	61

CD28 murino	ATGACCCTGCGCCTGCTGTTTCTGGCGCTG AACTTTTTTAGCGTGAGGTGACCGAAAACA AAATTCTGGTGAAACAGAGCCCGCTGCTGG TGGTGGATAGCAACGAAGTGAGCCTGAGCT GCCGCTATAGCTATAACCTGCTGGCGAAAG AATTCGCGCGAGCCTGTATAAAGGCGTGA ACAGCGATGTGGAAGTGTGCGTGGGCAACG GCAACTTTACCTATCAGCCGCAGTTTCGCAG CAACGCGGAATTTAACTGCGATGGCGATTTT GATAACGAAACCGTGACCTTTCGCCTGTGG AACCTGCATGTGAACCATACCGATATTTATTT TTGCAAATTGAATTTATGTATCCGCCGCCG TATCTGGATAACGAACGCAGCAACGGCACC ATTATTCATATTAAAGAAAAACATCTGTGCCA TACCCAGAGCAGCCCGAAACTGTTTTGGGC GCTGGTGGTGGTGGCGGGCGTGCTGTTTTG CTATGGCCTGCTGGTGACCGTGGCGCTGTG CGTGATTTGGACCAACAGCCGCCGCAACCG CCTGCTGCAGAGCGATTATATGAACATGACC CCGCGCCGCCCGGGCCTGACCCGCAAACC GTATCAGCCGTATGCGCCGGCGCGCGATTT TGCGGCGTATCGCCCG	62
CD28 murino	MTLRLLFLALNFFSVQVTENKILVKQSPLLVD SNEVSLSCRYSYNLLAKEFRASLYKGVNSDVE VCVGNNGFTYQPQFRSNAEFNCDGDFDNETV TFRLWNLHVNHTDIYFCKIEFMYPYPYLDNER SNGTIIHIKEKHLCHTQSSPKLFWALVVVAGVL FCYGLLVTVALCVIWTNSRRNRLLQSDYMNMT PRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRP	63
CD137 humano	ATGGGAAACAGCTGTTACAACATAGTAGCCA CTCTGTTGCTGGTCCTCAACTTTGAGAGGAC AAGATCATTGCAGGATCCTTGTAAGTAAGTGC CCAGCTGGTACATTCTGTGATAATAACAGGA ATCAGATTTGCAGTCCCTGTCCTCAAATAG TTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTG TGACATATGCAGGCAGTGTAAGGTGTTTTTC	64

	AGGACCAGGAAGGAGTGTTCTCCACCAGC AATGCAGAGTGTGACTGCACTCCAGGGTTT CACTGCCTGGGGGCAGGATGCAGCATGTGT GAACAGGATTGTAAACAAGGTCAAGAACTGA CAAAAAAAGGTTGTAAAGACTGTTGCTTTGG GACATTTAACGATCAGAAACGTGGCATCTGT CGACCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATGGAA AGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAGGAGA GGGACGTGGTCTGTGGACCATCTCCAGCCG ACCTCTCTCCGGGAGCATCCTCTGTGACCC CGCCTGCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACT CTCCGCAGATCATCTCCTTCTTTCTTGCGCT GACGTCGACTGCGTTGCTCTTCCTGCTGTTT TTCCTCACGCTCCGTTTCTCTGTTGTAAAC GGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA ACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACT CAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTT CCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG TGA	
CD137 humano	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCP AGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDI CRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTF NDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDV VCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQII SFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLY IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL	65
CD137 murino	ATGGGCAACAACCTGCTATAACGTGGTGGTG ATTGTGCTGCTGCTGGTGGGCTGCGAAAAA GTGGGCGCGGTGCAGAACAGCTGCGATAAC TGCCAGCCGGGCACCTTTTGCCGCAAATAT AACCCGGTGTGCAAAAGCTGCCCCGCCGAGC ACCTTTAGCAGCATTGGCGGCCAGCCGAAC TGCAACATTTGCCGCGTGTGCGCGGGCTAT TTTCGCTTTAAAAAATTTTGCAGCAGCACCC	66

	ATAACGCGGAATGCGAATGCATTGAAGGCTT TCATTGCCTGGGCCCCGAGTGACCCGCTG CGAAAAAGATTGCCGCCCCGGGCCAGGAACT GACCAAACAGGGCTGCAAAACCTGCAGCCT GGGCACCTTTAACGATCAGAACGGCACCGG CGTGTGCCGCCCCGTGGACCAACTGCAGCCT GGATGGCCGCAGCGTGCTGAAAACCGGCAC CACCGAAAAAGATGTGGTGTGCGGCCCGCC GGTGGTGAGCTTTAGCCCCGAGCACCACCAT TAGCGTGACCCCGGAAGGCGGCCCGGGCG GCCATAGCCTGCAGGTGCTGACCCTGTTTC TGGCGCTGACCAGCGCGCTGCTGCTGGCG CTGATTTTTATTACCCTGCTGTTTAGCGTGCT GAAATGGATTGCAAAAAATTTCCGCATATT TTTAAACAGCCGTTTAAAAAACACCGGCG CGGCGCAGGAAGAAGATGCGTGAGCTGC CGCTGCCCCGAGGAAGAAGAAGGCGGCGG CGGCGGCTATGAACTG	
CD137 murino	MGNNCYNVVVIVLLLVGCEKVGAVQNSCDNC QPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCNI CRVCAGYFRFKKFCSSTHNAECECIEGFHCLG PQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTEND QNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVV CGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSQVLTL FLALTSALLLALIFITLLFSVLKWIRKKFPHIFKQP FKKTTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL	67
OX40 humano	ATGTGCGTGGGCGCGCGCCGCTGGGCCG CGGCCCGTGCGCGGCGCTGCTGCTGCTGG GCCTGGGCCTGAGCACCGTGACCGGCCTG CATTGCGTGGGCGATACCTATCCGAGCAAC GATCGCTGCTGCCATGAATGCCGCCCCGGG AACGGCATGGTGAGCCGCTGCAGCCGCAG CCAGAACACCGTGTGCCGCCCCGTGCGGCC CGGGCTTTTATAACGATGTGGTGAGCAGCA AACCGTGCAAACCGTGACCTGGTGCAACC TGCGCAGCGGCAGCGAACGCAAACAGCTGT	68

	GCACCGCGACCCAGGATACCGTGTGCCGCT GCCGCGCGGGCACCCAGCCGCTGGATAGC TATAAACCGGGCGTGGATTGCGCGCCGTGC CCGCCGGGCCATTTTAGCCCGGGCGATAAC CAGGCGTGCAAACCGTGGACCAACTGCACC CTGGCGGGCAAACATACCCTGCAGCCGGCG AGCAACAGCAGCGATGCGATTTGCGAAGAT CGCGATCCGCCGGCGACCCAGCCGCAGGA AACCCAGGGCCCCGCCGGCGCGCCCGATTA CCGTGCAGCCGACCGAAGCGTGGCCGCGC ACCAGCCAGGGCCCCGAGCACCCGCCCGGT GGAAGTGCCGGGCGGCCGCGCGGTGGCGG CGATTCTGGGCCTGGGCCTGGTGCTGGGCC TGCTGGGCCCCGCTGGCGATTCTGCTGGCGC TGTATCTGCTGCGCCGCGATCAGCGCCTGC CGCCGGATGCGCATAAACCGCCGGGCGGC GGCAGCTTTCGCACCCCGATTCAGGAAGAA CAGGCGGATGCGCATAGCACCTGGCGAAA ATT	
OX40 humano	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCV GDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNT VCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSG SERKQLCTATQDTVCRRCRAGTQPLDSYKPGV DCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKH TLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPA RPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAV AAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPD AHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	69
OX40 murino	ATGTATGTGTGGGTGCAGCAGCCGACCGCG CTGCTGCTGCTGGCGCTGACCCTGGGCGTG ACCGCGCGCCGCCTGAACTGCGTGAAACAT ACCTATCCGAGCGGCCATAAATGCTGCCGC GAATGCCAGCCGGGCCATGGCATGGTGAGC CGCTGCGATCATACCCGCGATACCCTGTGC CATCCGTGCGAAACCGGCTTTTATAACGAAG CGGTGAACTATGATACCTGCAAACAGTGCAC	70

	CCAGTGCAACCATCGCAGCGGCAGCGAACT GAAACAGAACTGCACCCCGACCCAGGATAC CGTGTGCCGCTGCCGCCCCGGGCACCCAGC CGCGCCAGGATAGCGGCTATAAACTGGGCG TGGATTGCGTGCCGTGCCCGCCGGGCCATT TTAGCCCGGGCAACAACCAGGCGTGCAAAC CGTGGACCAACTGCACCCTGAGCGGCAAAC AGACCCGCCATCCGGCGAGCGATAGCCTGG ATGCGGTGTGCGAAGATCGCAGCCTGCTGG CGACCCTGCTGTGGGAAACCCAGCGCCCCGA CCTTTCGCCCCGACCACCGTGCGAGAGCACCA CCGTGTGGCCGCGCACCAGCGAACTGCCG AGCCCGCCGACCCTGGTGACCCCGGAAGG CCCGGCGTTTGCGGTGCTGCTGGGCCTGG GCCTGGGCCTGCTGGCGCCGCTGACCGTG CTGCTGGCGCTGTATCTGCTGCGCAAAGCG TGGCGCCTGCCGAACACCCCGAAACCGTGC TGGGGCAACAGCTTTCGCACCCCGATTGAG GAAGAACATACCGATGCGCATTTTACCCTGG CGAAAATT	
OX40 murino	MYVWVQQPTALLLALT LGVTARRLNCVKHTY PSGHKCCRECQPGHGMVSRCDHTRDTLCHP CETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQ NCTPTQDTVCRCPGTQPRQDSGYKLGVDC VPCPPGHFSPGNNQACKPWTNCTLSGKQTR HPASDSLDAVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPT TVQSTTVWPRTSELPSPPTLVTPGPAFAVLL GLGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRLPNTPKPC WGNSFRTPIQEEHTDAHFTLAKI	71
ICOS humano	ATGAAAAGCGGCCTGTGGTATTTTTTTCTGT TTTGCCTGCGCATTAAAGTGCTGACCGGCG AAATTAACGGCAGCGCGAACTATGAAATGTT TATTTTTCATAACGGCGGCGTGCGAGATTCTG TGCAAATATCCGGATATTGTGCGAGCAGTTTA AAATGCAGCTGCTGAAAGGCGGCCAGATTC TGTGCGATCTGACCAAACCAAAGGCAGCG	72

	GCAACACCGTGAGCATTAAAAGCCTGAAATT TTGCCATAGCCAGCTGAGCAACAACAGCGT GAGCTTTTTTCTGTATAACCTGGATCATAGC CATGCGAACTATTATTTTTGCAACCTGAGCA TTTTTGATCCGCCGCCGTTTAAAGTGACCCT GACCGGCGGCTATCTGCATATTTATGAAAGC CAGCTGTGCTGCCAGCTGAAATTTTGGCTG CCGATTGGCTGCGCGGCGTTTGTGGTGGTG TGCATTCTGGGCTGCATTCTGATTTGCTGGC TGACCAAAAAAAAAATATAGCAGCAGCGTGCA TGATCCGAACGGCGAATATATGTTTATGCGC GCGGTGAACACCGCGAAAAAAAGCCGCCTG ACCGATGTGACCCTG	
ICOS humano	MKSGLWYFFLFCLRIKVL TGEINGSANYEMFIF HNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDL TKTKSGSNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLY NLDHSHANYYFCNLSIFDPPPFKVTLTG GYLHI YESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVCILGCILICW LTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRL TDVTL	73
ICOS murino	ATGAAACCGTATTTTTGCCGCGTGTTTGTGT TTTGCTTTCTGATTCGCCTGCTGACCGGCGA AATTAACGGCAGCGCGGATCATCGCATGTTT AGCTTTCATAACGGCGGCGTG CAGATTAGC TGCAAATATCCGGAACCGTG CAGCAGCTG AAAATGCGCCTGTTTCGCGAACGCGAAGTG CTGTGCGAACTGACCAAAACCAAAGGCAGC GGCAACGCGGTGAGCATTAAAAACCCGATG CTGTGCCTGTATCATCTGAGCAACAACAGCG TGAGCTTTTTTCTGAACAACCCGGATAGCAG CCAGGGCAGCTATTATTTTTGCAGCCTGAGC ATTTTTGATCCGCCGCCGTTTCAGGAACGCA ACCTGAGCGGCGGCTATCTGCATATTTATGA AAGCCAGCTGTGCTGCCAGCTGAAACTGTG GCTGCCGGTGGGCTGCGCGGCGTTTGTGG TGGTGCTGCTGTTTGGCTGCATTCTGATTAT	74

	TTGGTTTAGCAAAAAAAAAAATATGGCAGCAGC GTGCATGATCCGAACAGCGAATATATGTTTA TGGCGGCGGTGAACACCAACAAAAAAGCC GCCTGGCGGGCGTGACCAGC	
ICOS murino	MKPYFCRVFVFCFLIRLLTGEINGSADHRMFSF HNGGVQISCKYPETVQQLKMRLFREREVLCEL TKTKGSGNAVSIKNPMLCLYHLSNNSVSFFLN NPDSSQGSYYFCSLSIFDPPPFQERNLSGGYL HIYESQLCCQLKLWLPVGCAAFVVLLFGCILII WFSKKKYGSSVHDPNSEYMFMAAVNTNKKSR LAGVTS	75
DAP10 humano	ATGATTCATCTGGGCCATATTCTGTTTCTGC TGCTGCTGCCGGTGGCGGCGGCAGACC ACCCCGGGCGAACGCAGCAGCCTGCCGGC GTTTTATCCGGGCACCAGCGGCAGCTGCAG CGGCTGCGGCAGCCTGAGCCTGCCGCTGC TGGCGGGCCTGGTGGCGGCGGATGCGGTG GCGAGCCTGCTGATTGTGGGCGCGGTGTTT CTGTGCGCGCGCCCGCGCCGCAGCCCGGC GCAGGAAGATGGCAAAGTGTATATTAACATG CCGGGCCGCGGC	76
DAP10 humano	MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYP GTSGSCSGCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIV GAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG	77
DAP10 murino	ATGGATCCGCCGGGCTATCTGCTGTTTCTG CTGCTGCTGCCGGTGGCGGCGAGCCAGAC CAGCGCGGGCAGCTGCAGCGGCTGCGGCA CCCTGAGCCTGCCGCTGCTGGCGGGCCTG GTGGCGGCGGATGCGGTGATGAGCCTGCT GATTGTGGGCGTGGTGTGTTGTGTGCATGCG CCCGCATGGCCGCCCGGCGCAGGAAGATG GCCGCGTGTATATTAACATGCCGGGCCGCG GC	78
DAP10 murino	MDPPGYLLFLLLLPVAASQTSAGSCSGCGTLS LPLLAGLVAADAVMSLLIVGVVFVCMRPHGRP	79

	AQEDGRVYINMPGRG	
DAP12 humano	ATGGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGCTC CTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGT GGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCAGGCCAG AGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCG GGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGA CCTGGTGCTGACAGTGCTCATTGCCCTGGC CGTGTACTTCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCG GGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCC GGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGC CTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGG ATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGC CGTATTACAAATGA	80
DAP12 humano	MGGLEPCSRLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSD CSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLG RLVPRGRGAEEAATRKQRITETESPYQELQG QRSVDVYSDLNTQRPYYK	81
DAP12 murino	ATGGGGGGCTCTGGAGCCCTCCTGGTGCCTT CTGTTCCCTTCCTGTCCTCCTGACTGTGGGAG GATTAAGTCCCGTACAGGCCAGAGTGACA CTTTCCCAAGATGCGACTGTTCTTCCGTGAG CCCTGGTGTACTGGCTGGGATTGTTCTGGG TGACTTGGTGTGACTCTGCTGATTGCCCTG GCTGTGTACTCTCTGGGCCGCCTGGTCTCC CGAGGTCAAGGGACAGCGGAAGGGACCCG GAAACAACACATTGCTGAGACTGAGTCGCCT TATCAGGAGCTTCAGGGTCAGAGACCAGAA GTATACAGTGACCTCAACACACAGAGGCAAT ATTACAGATGA	82
DAP12 murino	MGALEPSWCLLFLPVLLTVGGLSPVQAQSDTF PRCDCSSVSPGVLAGIVLGDLVLTLLIALAVYSL GRLVSRGQGTAEGTRKQHIAETESPYQELQG QRPEVYSDLNTQRQYYR	83
CD3z humano	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCY LLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQG	84

	QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	
CD3z humano	ATGAAGTGGAAAGGCGCTTTTCACCGCGGCC ATCCTGCAGGCACAGTTGCCGATTACAGAG GCACAGAGCTTTGGCCTGCTGGATCCCAAA CTCTGCTACCTGCTGGATGGAATCCTCTTCA TCTATGGTGTCAATTCTCACTGCCTTGTTCT GAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAGCC CCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGA GGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGA GAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGAC ACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG CCCCCTCGCTAA	85
CD3z murino	MKWKVSVLACILHVRFPGAEAQSFGLLDPKLC YLLDGILFIYGVITALYLRAKFSRSAETAANLQD PNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGG KQQRRRNPPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTK GERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQT LAPR	86
CD3z murino	ATGAAGTGGAAAGTGTCTGTTCTCGCCTGCA TCCTCCACGTGCGGTTCCAGGAGCAGAGG CACAGAGCTTTGGTCTGCTGGATCCCAAAT CTGCTACTTGCTAGATGGAATCCTCTTCATC TACGGAGTCATCATCACAGCCCTGTACCTGA GAGCAAAATTCAGCAGGAGTGCAGAGACTG CTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCT ACAATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGG AATATGACGTCTTGAGAAGAAGCGGGCTC	87

	GGGATCCAGAGATGGGAGGCAAACAGCAGA GGAGGAGGAACCCCCAGGAAGGCGTATACA ATGCACTGCAGAAAGACAAGATGGCAGAAG CCTACAGTGAGATCGGCACAAAAGGCGAGA GGCGGAGAGGCAAGGGGCACGATGGCCTT TACCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGAC ACCTATGATGCCCTGCATATGCAGACCCTG GCCCCTCGCTAA	
FCGR3A humano	MWQLLLPTALLLVSAAGMRTEDLPKAVVFLEP QWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFH NESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLST LSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLR CHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFY IPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSETVNITIT QGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDT GLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK	88
FCGR3A humano	ATGTGGCAGCTGCTGCTGCCGACCGCGCTG CTGCTGCTGGTGAGCGCGGGCATGCGCAC CGAAGATCTGCCGAAAGCGGTGGTGTTTCT GGAACCGCAGTGGTATCGCGTGCTGGAAAA AGATAGCGTGACCCTGAAATGCCAGGGCGC GTATAGCCCGGAAGATAACAGCACCCAGTG GTTTCATAACGAAAGCCTGATTAGCAGCCAG GCGAGCAGCTATTTTATTGATGCGGCGACC GTGGATGATAGCGGCGAATATCGCTGCCAG ACCAACCTGAGCACCCCTGAGCGATCCGGTG CAGCTGGAAGTGCATATTGGCTGGCTGCTG CTGCAGGCGCCGCGCTGGGTGTTTAAAGAA GAAGATCCGATTCATCTGCGCTGCCATAGCT GGAAAAACACCGCGCTGCATAAAGTGACCT ATCTGCAGAACGGCAAAGGCCGCAAATATTT TCATCATAACAGCGATTTTTATATTCCGAAAG CGACCCTGAAAGATAGCGGCAGCTATTTTGT CCGCGGCCTGTTTGGCAGCAAAAACGTGAG CAGCGAAACCGTGAACATTACCATTACCCAG GGCCTGGCGGTGAGCACCATTAGCAGCTTT	89

	TTTCCGCCGGGCTATCAGGTGAGCTTTTGC CTGGTGATGGTGCTGCTGTTTGCGGTGGAT ACCGGCCTGTATTTTAGCGTGAAAACCAACA TTCGCAGCAGCACCCGCGATTGGAAAGATC ATAAATTTAAATGGCGCAAAGATCCGCAGGA TAAA	
FCGR3A murino	MFQNAHSGSQWLLPPLTILLFADFDRQSAAL PKAVVKLDPPWIQVLKEDMVTLMCEGTHNPG NSSTQWFHNGRSIRSQVQASYTFKATVND SG EYRCQMEQTRLSDPVDLGVISDWLLLQTPQR VFLEGETITLRCHSWRNKLLNRISFFHNEKSVR YHHYKSNFSIPKANHSHSGDYYCKGSLGSTQ HQSKPVTITVQDPATTSSISLVWYHTAFSLVMC LLFAVD TG LYFYVRRNLQTPREYWRKSL S IRK HQAPQDK	90
FCGR3A murino	ATGTTTCAGAAATGCACACTCTGGAAGCCAAT GGCTACTTCCACCACTGACAATTCTGCTGCT GTTTGCTTTTG CAGACAGGCAGAGTGCAGC TCTTCCGAAGGCTGTGGTGAAACTGGACCC CCCATGGATCCAGGTGCTCAAGGAAGACAT GGTGACACTGATGTGCGAAGGGACCCACAA CCCTGGGA ACTCTTCTACCCAGTGGTTCCAC AACGGGAGGTCCATCCGGAGCCAGGTCCAA GCCAGTTACACGTTTAAGGCCACAGTCAATG ACAGTGGAGAATATCGGTGTCAAATGGAGC AGACCCGCCTCAGCGACCCTGTAGATCTGG GAGTGATTTCTGACTGGCTGCTGCTCCAGA CCCCTCAGCGGGTGTTTCTGGAAGGGGAAA CCATCACGCTAAGGTGCCATAGCTGGAGGA ACAACTACTGAACAGGATCTCATTCTTCCA TAATGAAAAATCCGTGAGGTATCATCACTAC AAAAGTAATTTCTCTATCCCAAAGCCAACC ACAGTCACAGTGGGGACTACTACTGCAAAG GAAGTCTAGGAAGTACACAGCACCAAGTCCA AGCCTGTCACCATCACTGTCCAAGATCCAGC AACTACATCCTCCATCTCTCTAGTCTGGTAC	91

	CACACTGCTTTCTCCCTAGTGATGTGCCTCC TGTTTGCAGTGGACACGGGCCTTTATTTCTA CGTACGGAGAAATCTTCAAACCCCGAGGGA GTACTGGAGGAAGTCCCTGTCAATCAGAAA GCACCAGGCTCCTCAAGACAAGTGA	
NKG2D humano	MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDF STRWQKQRCPVVKSARENASPPFFCCFIAV AMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESY CGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWWYESQAS CMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGL VHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDC ALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV	92
NKG2D humano	ATGGGCTGGATTGCGGGCCGCGCAGCCG CCATAGCTGGGAAATGAGCGAATTTTCATAAC TATAACCTGGATCTGAAAAAAGCGATTTTA GCACCCGCTGGCAGAAACAGCGCTGCCCG GTGGTGAAAAGCAAATGCCGCGAAAACGCG AGCCCGTTTTTTTTTGTCTGCTTTATTGCGGT GGCGATGGGCATTCGCTTTATTATTATGGTG GCGATTTGGAGCGCGGTGTTTCTGAACAGC CTGTTTAACCAGGAAGTGCAGATTCCGCTGA CCGAAAGCTATTGCGGCCCGTGCCCGAAAA ACTGGATTTGCTATAAAAAACAAGTCTATCA GTTTTTTGATGAAAGCAAAAAGTGGTATGAA AGCCAGGCGAGCTGCATGAGCCAGAACGC GAGCCTGCTGAAAGTGTATAGCAAAGAAGAT CAGGATCTGCTGAAAGTGGTGAAAAGCTATC ATTGGATGGGCCTGGTGCATATTCCGACCA ACGGCAGCTGGCAGTGGGAAGATGGCAGC ATTCTGAGCCCGAACCTGCTGACCATTATTG AAATGCAGAAAGGCGATTGCGCGCTGTATG CGAGCAGCTTTAAAGGCTATATTGAAAAGT CAGCACCCCGAACACCTATATTGTCATGCAG CGCACCGTG	93
NKG2D murino	MALIRD RKSHHSEMSKCHNYDLKPAKWDT SQ EQQKQRLALTTSQPGENGIIRGRYP I EKLKISP	94

	MFVVRVLAIALAIRFTLNTLMWLAIFKETFPVL CNKEVPVSSREGYCGPCPNNWICHNRNNCYQF FNEEKTWNQSQASCLSQNSSLLKIYSKEEQDF LKLVKSYHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSLSY NQLTLVEIPKGSACAVYGSSFKAYTEDCANLNT YICMKRAV	
NKG2D murino	ATGGCGCTGATTCGCGATCGCAAAAGCCAT CATAGCGAAATGAGCAAATGCCATAACTATG ATCTGAAACCGGCGCAAATGGGATACCAGCC AGGAACAGCAGAAACAGCGCCTGGCGCTGA CCACCAGCCAGCCGGGCGAAAACGGCATT TTCGCGGCCGCTATCCGATTGAAAACTGAA AATTAGCCCGATGTTTGTGGTGCGCGTGCT GGCGATTGCGCTGGCGATTCGCTTTACCCT GAACACCCTGATGTGGCTGGCGATTTTTAAA GAAACCTTTCAGCCGGTGCTGTGCAACAAA GAAGTGCCGGTGAGCAGCCGCGAAGGCTAT TGCGGCCCGTGCCCGAACAACCTGGATTTGC CATCGCAACAACCTGCTATCAGTTTTTTAACG AAGAAAAACCTGGAACCAGAGCCAGGCGA GCTGCCTGAGCCAGAACAGCAGCCTGCTGA AAATTTATAGCAAAGAAGAACAGGATTTTCT GAACTGGTGAAAAGCTATCATTGGATGGG CCTGGTGAGATTCCGGCGAACGGCAGCTG GCAGTGGGAAGATGGCAGCAGCCTGAGCTA TAACCAGCTGACCCTGGTGGAAATTCCGAAA GGCAGCTGCGCGGTGTATGGCAGCAGCTTT AAAGCGTATACCGAAGATTGCGCGAACCTG AACACCTATATTTGCATGAAACGCGCGGTG	95
CD28 YMNM	YMNM	96
CD28 PYAP	PYAP	97
CD28 FMNM	FMNM	98
CD28 AYAA	AYAA	99
Péptido de señal	ATMGWSCIIILFLVATATGVHS	100

Secuencia de ADN de péptido de señal	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGG TAGCAACAGCTACCGGTGTGCACTCC	101
Cadena pesada anti-CD20 (GA101)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSY SWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYN GKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAV YYCARNVFDGYWL VYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	102
Cadena liviana anti-CD20 (GA101)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSN GITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNL ELPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	103
Cadena pesada de PGLALA anti-FAP (4B9)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN	104

	GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	
Cadena liviana anti- FAP (4B9)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSY LAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	105
Cadena pesada de PGLALA anti- CEA (A5B7)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSS YWMHWVRQAPGKGLEWVGFI RNKANGGTTE YAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDRLRFYFDYWGGQTTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	106
Cadena liviana anti- CEA (A5B7)	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRGINVGA YSIYWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSG VSSRFSAKSDASANAGILLISGLQSEDEADYYC MIWHSGASAVFGGGTKLTVLRRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	107

Cadena pesada de PGLALA anti-CEA (T84.66LCHA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDT YMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVP KFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	108
Cadena liviana anti-CEA (T84.66LCHA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFG VGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQTNE DPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	109
Cadena pesada de PGLALA anti-CEA (CH1A1A98/92F1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTE FGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYV EEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT	110

	QKSLSLSPGK	
Cadena liviana anti- CEA (CH1A1A98/9 92F1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASAAVGTY VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYP LFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	111
Cadena pesada de PGLALA anti- CEA (hMN14)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFDFTT YWMSWVRQAPGKGLEWIGEIHPSSTINYAP SLKDRFTISRDNANKNTLFLQMDSL RPEDTGVY FCASLYFGFPWFAYWGQGPVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	112
Cadena liviana anti- CEA (hMN14)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDVGTS VAWYQQKPGKAPKLLIYWSTRHTGVPSRFS GSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQYSLYRS FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	113
Cadena pesada de PGLALA anti- TNC (2B10)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQK FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARLYGYAYYGAFDYWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV	114

	TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
Cadena liviana anti- TNC (2B10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQNGLQP ATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	115
Fc de IgG1 humana	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK	116
CD8 humano	MRNQAPGRPKGATFPPRRPTGSRAPPLAPEL RAKQRPGERVMALPVTALLPLALLLHAARPS QFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSG CSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLD TQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSA LSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVC	117

	KCPRPVVKSGDKPSLSARYV	
CD8 humano	ATGCGCAACCAGGCGCCGGGCCCGCCCGAA AGGCGCGACCTTTCCGCCGCGCCGCCCGA CCGGCAGCCGCGCGCCGCCGCTGGCGCCG GAACTGCGCGCGAAACAGCGCCCGGGCGA ACGCGTGATGGCGCTGCCGGTGACCGCGC TGCTGCTGCCGCTGGCGCTGCTGCTGCATG CGGCGCGCCCGAGCCAGTTTCGCGTGAGC CCGCTGGATCGCACCTGGAACCTGGGCGAA ACCGTGGAAGTAAATGCCAGGTGCTGCTG AGCAACCCGACCAGCGGCTGCAGCTGGCTG TTTCAGCCGCGCGGCGCGGCGGCGAGCCC GACCTTTCTGCTGTATCTGAGCCAGAACAAA CCGAAAGCGGCGGAAGGCCTGGATACCCA GCGCTTTAGCGGCAAACGCCTGGGCGATAC CTTTGTGCTGACCCTGAGCGATTTTCGCCGC GAAAACGAAGGCTATTATTTTTGCAGCGCGC TGAGCAACAGCATTATGTATTTTAGCCATTTT GTGCCGGTGTTTCTGCCGGCGAAACCGACC ACCACCCCGGCGCCGCGCCCGCCGACCCC GGCGCCGACCATTGCGAGCCAGCCGCTGA GCCTGCGCCCGGAAGCGTGCCGCCCGGCG GCGGGCGGCGCGGTGCATACCCGCGGCCT GGATTTTGCGTGCGATATTTATATTTGGGCG CCGCTGGCGGGCACCTGCGGCGTGCTGCT GCTGAGCCTGGTGATTACCCTGTATTGCAAC CATCGCAACCGCCGCCGCGTGTGCAAATGC CCGCGCCCGGTGGTGAAAAGCGGCGATAAA CCGAGCCTGAGCGCGCGCTATGTG	118
CD8 murino	MASPLTRFLSLNLLLMGESIILGSGEAKPQAPE LRIFPKKMDAELGQKVDLVCEVLGVSQGC WLFQNSSSKLPQPTFVVYMASSHNKITWDEKL NSSKLFSVRDTNNKYVLTlnKFSKENEGYYF CSVISNSVMYFSSVVPVLQKVNSTTTKPVLR PSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDF ACDIYIWAPLAGICVAPLLSLITLICYHRSRKR	119

	CKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV	
CD8 murino	ATGGCGAGCCCGCTGACCCGCTTTCTGAGC CTGAACCTGCTGCTGATGGGCGAAAGCATT ATTCTGGGCAGCGGCGAAGCGAAACCGCAG GCGCCGGAAGTGCATTTTTCCGAAAAAAA TGGATGCGGAAGTGGGCCAGAAAGTGGATC TGGTGTGCGAAGTGCTGGGCAGCGTGAGCC AGGGCTGCAGCTGGCTGTTTCAGAACAGCA GCAGCAAAGTGCAGCGACCGACCTTTGTGG TGTATATGGCGAGCAGCCATAACAAAATTAC CTGGGATGAAAACTGAACAGCAGCAAAGT GTTTAGCGCGGTGCGCGATACCAACAACAA ATATGTGCTGACCCTGAACAAATTTAGCAAA GAAAACGAAGGCTATTATTTTTGCAGCGTGA TTAGCAACAGCGTGATGTATTTTAGCAGCGT GGTGCCGGTGCTGCAGAAAGTGAACAGCAC CACCACCAAACCGGTGCTGCGCACCCCGAG CCCGGTGATCCGACCGGCACCAGCCAGC CGCAGCGCCCGGAAGATTGCCGCCCGCGC GGCAGCGTGAAAGGCACCGGCCTGGATTTT GCGTGCGATATTTATATTTGGGCGCCGCTG GCGGGCATTGCGTGCGCGCCGCTGCTGAG CCTGATTATTACCCTGATTTGCTATCATCGC AGCCGCAAACGCGTGTGCAAATGCCCGCGC CCGCTGGTGCGCCAGGAAGGCAAACCGCG CCCGAGCGAAAAAATTGTG	120

Tabla 9: Secuencias de aminoácidos CAR P329G VH1VL1 de ejemplo:

Definición de CDR de acuerdo con Kabat

Constructo	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VH1 CDR H1	Ver tabla 2	1
VH1 CDR H2	Ver tabla 6	40

VH1 CDR H3	Ver tabla 2	3
VL1 CDR L1	Ver tabla 2	4
VL1 CDR L2	Ver tabla 2	5
VL1 CDR L3	Ver tabla 2	6
Fusión VH1VL1- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDfsry WMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYTPSL KGRFTISRDNakNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG GSGGGGSGGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDE AEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGSLKP TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELrvKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLdkRRGRDPemGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	121
VH1 VH	Ver tabla 6	41
VL1 VL	Ver tabla 2	9
VH1VL1 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDfsry WMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYTPSL KGRFTISRDNakNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG GSGGGGSGGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDE AEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	122
CD8ATD	Ver tabla 2	11
CD137CSD	Ver tabla 2	12
CD3zSSD	Ver tabla 2	13
CD28ATD- CD137CSD-	Ver tabla 2	14

CD3zSSD		
eGFP	Ver tabla 2	15
Ligador (G4S) ₄	Ver tabla 2	16
Ligador G4S	Ver tabla 2	17
Ligador T2A	Ver tabla 2	18
CD8stalk	Ver tabla 2	19

Tabla 10: Secuencias de aminoácidos CAR P329G VH2VL1 de ejemplo:

Definición de CDR de acuerdo con Kabat

Constructo	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VH2 CDR H1	Ver tabla 2	1
VH2 CDR H2	Ver tabla 2	2
VH2 CDR H3	Ver tabla 2	3
VL1 CDR L1	Ver tabla 2	4
VL1 CDR L2	Ver tabla 2	5
VL1 CDR L3	Ver tabla 2	6
Fusión VH2VL1- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDISR YWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAP SLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLF TGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL GGGSLKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTC GVLLLSLVITKRGKRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR	123
VH2 VH	Ver tabla 6	44

VL1 VL	Ver tabla 2	9
VH2VL1 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSR YWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAP SLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGGSQAVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLF TGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	124
CD8ATD	Ver tabla 2	11
CD137CSD	Ver tabla 2	12
CD3zSSD	Ver tabla 2	13
CD28ATD- CD137CSD- CD3zSSD	Ver tabla 2	14
eGFP	Ver tabla 2	15
Ligador (G4S) ₄	Ver tabla 2	16
Ligador G4S	Ver tabla 2	17
Ligador T2A	Ver tabla 2	18
CD8stalk	Ver tabla 2	19

Tabla 11: Secuencias de aminoácidos CAR P329G VH3VL1 estabilizadas mediante disulfuro de ejemplo:

Definición de CDR de acuerdo con Kabat

Construto	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VH3 CDR H1	Ver tabla 2	1
VH3 CDR H2	Ver tabla 2	2
VH3 CDR H3	Ver tabla 2	3
VL1 CDR L1	Ver tabla 2	4
VL1 CDR L2	Ver tabla 2	5
VL1 CDR L3	Ver tabla 2	6
Fusión VH3VL1(ds)-	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY WMNWVRQAPGKCLEWVGEITPDSSTINYAPSL	125

CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD	KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPED EAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVLGGGGSLK PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
VH3 (ds) VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY WMNWVRQAPGKCLEWVGEITPDSSTINYAPSL KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RPYDYGAWFASWGQGTLVTVSS	126
VL1 (ds) VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSN YANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFS GSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNH WVFGCGTKLTVL	127
VH3VL1 (ds) scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY WMNWVRQAPGKCLEWVGEITPDSSTINYAPSL KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPED EAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVL	128
CD8ATD	Ver tabla 2	11
CD137CSD	Ver tabla 2	12
CD3zSSD	Ver tabla 2	13
CD28ATD- CD137CSD- CD3zSSD	Ver tabla 2	14

eGFP	Ver tabla 2	15
Ligador (G4S) ⁴	Ver tabla 2	16
Ligador G4S	Ver tabla 2	17
Ligador T2A	Ver tabla 2	18
CD	Ver tabla 2	19
8stalk		

Tabla 12: Otras secuencias de aminoácidos CAR VH3VL1 P329G (HuR968B) de ejemplo:

Definición de CDR de acuerdo con Kabat

Constructo	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VH3 CDR H1	RYWMN	1
VH3 CDR H2	EITPDSSTINYAPSLKG	2
VH3 CDR H3	PYDYGAWFAS	3
VL1 CDR L1	RSSTGAVTTSNYAN	4
VL1 CDR L2	GTNKRAP	5
VL1 CDR L3	ALWYSNHWW	6
Fusión VH3VL1- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD (HuR968B)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY WMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAPSL KGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RPYDYGAWFASWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSTVSPGGTVT LTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPED EAEYYCALWYSNHWWVFGGGTKLTVLGGGGSY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	129

HuR968B ADN	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTACTACTGC CCCTGGCCCTTCTGCTTCATGCTGCTAGACCT GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGGGGGGGC TTGGTTCAGCCTGGGGGCAGCCTGAGACTGA GCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAG ATATTGGATGAACTGGGTGAGACAAGCCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGGGAGATC ACCCCTGACAGCAGCACCATCAACTATGCCC CTAGCCTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCAG AGACAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACAGCTG TGACTATTGTGCTAGACCCTATGACTATGGG GCCTGGTTTGCTAGCTGGGGCCAAGGCACCC TAGTAACAGTGTCTCTGGGGGGGGGAGGATC TGGGGGGGGGGGTTCTGGGGGGGGGGGCT CTGGTGGGGGGGGTTCTCAAGCTGTGGTAAC ACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGAGCCCTGGG GGCACAGTGACCCTGACCTGCAGAAGCAGCA CTGGGGCTGTGACCACAAGCAACTATGCCAA CTGGGTGCAAGAGAAGCCTGACCACCTGTTC ACTGGCCTGATTGGGGGCACCAATAAGAGAG CACCTGGCACTCCTGCTAGATTTTCTGGCTCA CTGCTGGGGGGGCAAGGCTGCCTTGACCCTTT CTGGGGCTCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTA CTACTGTGCTCTCTGGTACAGCAACCACTGG GTGTTTGGGGGGGGGCACCAAGCTGACAGTG CTGGGGGGGGGGGGTAGCATCTACATCTGG GCCCCCTGGCTGGCACATGTGGGGTGCTG CTGCTGAGCCTGGTGATCACCTGTACTGCA AGAGAGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTT CAAGCAGCCCTTCATGAGACCTGTGCAGACC ACCAAGAGGAGGATGGCTGCAGCTGCAGAT TCCCTGAGGAGGAGGAGGGGGGCTGTGAGC TGAGAGTGAAGTTCAGCAGATCTGCTGATGC CCCTGCCTATCAGCAAGGGCAGAATCAGCTG TATAATGAGCTCAACCTGGGCAGAAGAGAGG	130
------------------------	--	------------

	AGTATGATGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAG AGACCCTGAGATGGGGGGCAAGCCTAGAAGA AAGAACCCCCAAGAGGGCCTGTACAATGAGC TGCAAAAGGACAAGATGGCTGAGGCCTACTC TGAGATTGGCATGAAGGGGGAGAGAAGAAGA GGCAAGGGCCATGATGGCCTGTACCAAGGCC TGAGCACAGCCACCAAGGACACTTATGATGC CTTGACATGCAAGCCCTGCCTCCAAGATGA	
VH3 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY WMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAPSL KGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RPYDYGAWFASWGQGTLLTVSS	8
VL1 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSN YANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPARFS GSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNH WVFGGGTKLTVL	9
VH3VL1 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY WMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAPSL KGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RPYDYGAWFASWGQGTLLTVSSGGGGSGGG SGGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPED EAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	10
CD8ATD'	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	131
CD137CSD	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEEGGCEL	12
CD3zSSD	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	13
Ligador (G4S)4	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	16
Ligador G4S	GGGGS	17
Ligador T2A	GEGRGSLLTCGDVEENPGP	18

Tabla 13: Otras secuencias de aminoácidos CAR VH3VL1 P329G (HuR9684M) de ejemplo:

Definición de CDR de acuerdo con Kabat

Constructo	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VH3 CDR H1	RYWMN	1
VH3 CDR H2	EITPDSSTINYAPSLKG	2
VH3 CDR H3	PYDYGAWFAS	3
VL1 CDR L1	RSSTGAVTTSNYAN	4
VL1 CDR L2	GTNKRAP	5
VL1 CDR L3	ALWYSNHWW	6
Fusión VH3VL1- CD8ATD- CD137CSD- CD3zSSD (HuR9684M)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSR YWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAP SLKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLF TGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYICALWYSNHWWVFGGGTKLTVL ESKYGPPCPPCPFWVLVVGVLACYSLLVTV AFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRK HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	132
HuR968B ADN	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTATTACTG CCCCTGGCCCTTCTGTTACATGCTGCTAGAC CTGAGGTTCAACTGGTGGAGTCTGGGGGGG GCCTAGTGCAGCCTGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCA GCAGATACTGGATGAACTGGGTGAGACAAG CCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGG GAGATCACCCCTGACAGCAGCACCATCAAC TATGCCCTAGCCTGAAGGGCAGATTCACC	133

ATCAGCAGAGACAATGCCAAGAACAGCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAG GACACAGCTGTGTATTATTGTGCTAGACCAT ATGACTATGGGGCCTGGTTTGCCTCTTGGG GCCAAGGCACACTGGTTACAGTGAGTTCTG GGGGGGGGGGTTCTGGAGGGGGGGGATCT GGGGGTGGAGGTTCTGGGGGGGGGGGCAG TCAAGCTGTGGTGACCCAAGAGCCTAGCCT GACAGTGTCCCCTGGGGGCACAGTCACCCT GACCTGCAGAAGCAGCACTGGGGCTGTGAC CACAAGCAACTATGCCAACTGGGTGCAAGA GAAGCCTGACCACCTGTTCACTGGCCTGATT GGGGGCACCAACAAAAGAGCCCCTGGCACC CCTGCTAGATTCTCTGGAAGCCTGTTGGGG GGCAAGGCTGCCCTGACCCTATCTGGGGCA CAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTACTACTGT GCCCTCTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTT GGGGGGGGGCACCAAAGTACAGTGTTGGA GAGCAAGTATGGCCCCCCTGTCCTCCCTG TCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTTGTGGGGGG GGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGAC AGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGAAGC AAGAGAAGCAGACTGCTGCACTCTGACTAC ATGAACATGACCCCTAGAAGACCTGGCCCC ACAAGAAAGCACTATCAGCCCTATGCCCCC CCTAGAGACTTTGCTGCCTACAGAAGCAGA GTGAAGTTCAGCAGATCTGCTGATGCCCCT GCCTATCAGCAAGGGCAGAATCAGCTGTAT AATGAGCTCAACCTGGGCAGAAGAGAGGAG TATGATGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGA GACCCTGAGATGGGGGGCAAGCCTAGAAGA AAGAACCCCAAGAGGGCCTGTACAATGAG CTGCAAAAGGACAAGATGGCTGAGGCCTAC TCTGAGATTGGCATGAAGGGGGAGAGAAGA AGAGGCAAGGGCCATGATGGCCTGTACCAA GGCCTGAGCACAGCCACCAAGGACACCTAT	
---	--

	GATGCCCTACATATGCAAGCTCTGCCCCCTA GATGA	
VH3 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSR YWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAP SLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSS	8
VL1 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWY SNHWVFGGGTKLTVL	9
VH3VL1 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSR YWMNWVRQAPGKGLEWVGEITPDSSTINYAP SLKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARPYDYGAWFASWGQGTLVTVSSGGGGS GGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLF TGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	10
CD28ATD	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	134
CD137CSD	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL	12
CD3zSSD	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDLGYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	13
Ligador (G4S)4	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	16
Ligador IgG4m	ESKYGPPCPPCP	135
Ligador T2A	GEGRGSLLTCGDVEENPGP	18

Tabla 14: Otros dominios de VH/VL de anticuerpo de ejemplo:

A6 VH	EVQLLDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVM SWVRQAPGKGLNWWSTISHSGGSTYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIDAPYYD	136
-------	---	------------

	ILTG YRYWGQGT LVT VSS	
A6 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAW YQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSSSYTFGQGTKLEI K	137
Zmab VH	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWIN WVKQRPQGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKFKDKATL TVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRSWRGNS FDYWGQGTTLTVSS	138
Zmab VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQ KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFT GSGSGTDFLTISLVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTF GSGTKLEIK	139

Ejemplos

A continuación, se presentan ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que diversas modalidades adicionales pueden ponerse en práctica, en función de la descripción general proporcionada anteriormente.

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron métodos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook y otros, *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos de biología molecular se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general relacionada con las secuencias de nucleótidos de las cadenas pesada y liviana de las inmunoglobulinas humanas se proporciona en: Kabat, E.A. *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., publicación NIH N.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación de la doble cadena.

Síntesis génica

Los segmentos génicos deseados, en caso de ser necesario, se generaron mediante PCR usando plantillas adecuadas o se sintetizaron mediante Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automatizada. En casos donde la secuencia génica exacta no estuvo disponible,

se diseñaron cebadores oligonucleotídicos basados en las secuencias de los homólogos más cercanos y los genes se aislaron mediante RT-PCR a partir de ARN derivado del tejido adecuado. Los segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares se clonaron en vectores de clonación / secuenciación estándar. El ADN plasmídico se purificó a partir de bacterias transformadas y la concentración se determinó mediante espectroscopía UV. La secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados se confirmó mediante secuenciación del ADN. Los segmentos génicos se diseñaron con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los vectores de expresión respectivos. Todas las construcciones se diseñaron con una secuencia de ADN en el extremo 5' que codifica un péptido líder que dirige la secreción de las proteínas en células eucariotas.

Producción de proteínas similares a IgG en células HEK293 EBNA o CHO EBNA

Los anticuerpos y anticuerpos biespecíficos se generaron mediante transfección transitoria de células HEK293 EBNA o células CHO EBNA. Las células se centrifugaron y el medio se reemplazó con medio CD CHO calentado previamente (Thermo Fisher, Cat. # 10743029). Se mezclaron vectores de expresión en medio CD CHO, se agregó PEI (polietilenimina, Polysciences, Inc, cat. n.º 23966-1) y la solución se agitó en vórtice y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, las células (2 mio/ml) se mezclaron con la solución de vector/PEI, se transfirieron a un matraz y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con agitación con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después de la incubación, se añadió medio Excell con suplementos (80 % de volumen total) (W. Zhou y A. Kantardjieff, *Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing*, DOI: 10.1007/978-3-642-54050-9; 2014). Un día después de la transfección, se agregaron complementos (alimentación, 12 % de volumen total). Los sobrenadantes celulares se cosecharon después de 7 días mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm), y las proteínas se purificaron a partir del sobrenadante cosechado mediante métodos estándares según se indica a continuación.

Producción de proteínas similares a IgG en células CHO K1

De manera alternativa, los anticuerpos y anticuerpos biespecíficos descritos en la presente fueron preparados por Evitria mediante el uso del sistema de vectores de su propiedad con técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR) y mediante el uso de células CHO K1 adaptadas a suspensión (originalmente recibidas de ATCC y adaptadas a crecimiento sin suero en cultivo en suspensión en Evitria). Para la producción, Evitria usó sus medios patentados, libres de componentes animales y libres

de suero (eviGrow y eviMake2) y su reactivo de transfección patentado (eviFect). El sobrenadante se cosechó mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 μm) y las proteínas se purificaron a partir del sobrenadante cosechado mediante métodos estándares.

Purificación de proteínas similares a IgG

Las proteínas se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo celular filtrados con referencia a los protocolos estándares. En resumen, las proteínas que contenían Fc se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares mediante cromatografía de afinidad de proteína A (amortiguador de equilibrio: 20 mM de citrato de sodio, 20 mM de fosfato de sodio, pH 7,5; amortiguador de elución: 20 mM de citrato de sodio, pH 3,0). La elución se logró a pH 3,0 y luego neutralización inmediata de la muestra. La proteína se concentró mediante centrifugación (Millipore Amicon® ULTRA-15 (N.º de art.: UFC903096), y la proteína agregada se separó de la proteína monomérica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en 20 mM de histidina, 140 mM de cloruro de sodio, pH 6,0.

Análítica de proteínas similares a IgG

Las concentraciones de las proteínas purificadas se determinaron mediante la medición de la absorción a 280 nm con el uso del coeficiente de extinción en masa calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace, *et al.*, Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. La pureza y el peso molecular de las proteínas se analizaron mediante CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor con el uso de un LabChipGXII o LabChip GX Touch (Perkin Elmer) (Perkin Elmer). La determinación del contenido de agregados se realizó mediante cromatografía HPLC a 25 °C usando una columna analítica de exclusión por tamaño (TSKgel G3000 SW XL o UP-SW3000, Tosoh Bioscience) equilibrada en el amortiguador de desplazamiento (200 mM de KH_2PO_4 , 250 mM de KCl pH 6,2, NaN_3 al 0,02 %).

Preparación de sobrenadantes de lentivirus y transducción de células Jurkat-NFAT

Se llevó a cabo una transfección a base de Lipofectamine LTX™ usando ~80 % de células Hek293T confluentes (ATCC CRL3216) y vectores de transferencia que codifican CAR, así como los vectores de empaquetamiento pCAG-VSVG y psPAX2 en una relación molar 2:2:1 (Giry-Laterriere M, *et al* Methods Mol Biol. 2011;737:183-209, Myburgh R, *et al* Mol Ther Nucleic Acids. 2014). Después de 66 h, el sobrenadante se recolectó, se centrifugó durante 5 min a 350×g y se filtró a través de un filtro de polietersulfona de 0,45

µm para recolectar y purificar las partículas de virus. Las partículas de virus se usaron directamente o se concentraron (Lenti-x-Concentrator, Takara) y se usaron para infección por centrifugación de linfocitos T Jurkat NFAT (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega #CS176501 a 900×g durante 2 h y 31°C.

Ensayo de activación de Jurkat NFAT

El ensayo de activación de Jurkat NFAT mide la activación de linfocitos T de una línea celular indicadora de leucemia linfática aguda humana (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega #CS176501). Esta línea de linfocitos T inmortalizados se modifica por ingeniería genética para expresar de manera estable un indicador de luciferasa impulsado por un elemento de respuesta a NFAT (NFAT-RE). Además, la línea celular expresa un constructo de receptor de antígeno quimérico (CAR) que posee un dominio de señalización de CD3z. La unión de CAR a una molécula adaptadora inmovilizada (por ejemplo, una molécula adaptadora unida al antígeno tumoral) da lugar a la reticulación de CAR que produce la activación de linfocitos T y la expresión de luciferasa. Después de la adición de un sustrato, los cambios celulares de la actividad de NFAT se pueden medir como unidades relativas de luz (Darowski *et al.* Protein Engineering, Design and Selection, volumen 32, edición 5, mayo de 2019, páginas 207–218, <https://doi.org/10.1093/protein/gzz027>). En general, el ensayo se llevó a cabo en una placa de 384 (Falcon #353963 blanca, fondo transparente). Las células diana (células CAR-Jurkat-NFAT) y células efectoras se sembraron en una relación 1:5 (2000 células diana y 10.000 células efectoras) en 10 µl cada una, en RPMI- 1640+10 % de FCS+1 % de Glutamax (medio de cultivo) en triplicados. Asimismo, una dilución en serie del anticuerpo de interés se preparó en el medio de cultivo para obtener concentraciones finales que variaron de 67 nM a 0,000067 nM en la placa de ensayo con un volumen final de 30 µl por cavidad en total. La placa de 384 cavidades se centrifugó durante 1 min a 300g y RT y se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ en una atmósfera de humedad. Después de 7 h de incubación, se agregó 20 % del volumen final del ensayo de luciferasa ONE-Glo™ (E6120, Promega), y las placas se centrifugaron durante 1 min a 350×g. A continuación, las unidades relativas de luminiscencia (RLU) por s/cavidad se midieron inmediatamente usando un lector de microplacas Tecan. Las curvas concentración-respuesta se ajustaron, y los valores de EC₅₀ se calcularon usando GraphPadPrism versión 7. Como valor de p se usó el estilo de New England Journal of Medicine como se enumera en el GraphPadPrism 7. Significado *= P ≤ 0,033; **= P ≤ 0,002; ***= P ≤ 0,001.

Ejemplo 1

Generación y caracterización de anticuerpos anti-P329G humanizados

Se produjeron anticuerpos anti-P329G parentales y humanizados en células HEK y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de Proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Todos los anticuerpos se purificaron con buena calidad (tabla 2).

Tabla 2 - Análisis bioquímico de anticuerpos anti-P329G. Contenido de monómeros determinado mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Pureza determinada mediante electroforesis capilar SDS en condiciones no reductoras.

Molécula	Monómero [%]	Pureza [%]
HulgG1 anti-P329G (M-1.7.24)	100	85
hulgG1 anti-P329G (VH1VL1)	100	97
hulgG1 anti-P329G (VH2VL1)	100	87
hulgG1 anti-P329G (VH3VL1)	100	97

Unión de variantes parentales y de seis humanizaciones del aglutinante anti-P329G M-1.7.24 al Fc humano (P329G)

Instrumentación:	Biacore T200
Chip:	CM5 (# 772)
Fc1 a 4:	anti-Fab humano específico (GE Healthcare 28-9583-25)
Captura:	50 nM de IgG durante 60 s
Analito:	Fc humano (P329G) (P1AD9000-004)
Amortiguador de desplazamiento:	HBS-EP
T°:	25 °C
Dilución:	dilución de 2 veces en HBS-EP desde 0,59 hasta 37,5 nM
Flujo:	30 µl/min
Asociación:	240 s
Disociación:	800 s
Regeneración:	10 mM de glicina, pH 2,1 durante 2x60 s

Los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore T200 con HBS-EP+ como amortiguador de desplazamiento (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 al 0,005 % (BR-1006-69, GE Healthcare)). Los anticuerpos específicos anti-Fab humano (GE Healthcare 28-9583-25) se inmovilizaron directamente mediante acoplamiento con amina en un chip CM5 (GE Healthcare). Las IgG se capturaron durante 60 s a 50 nM. Se

pasó una serie de dilución dos veces del Fc humano (P329G) sobre el ligando a 30 μ l/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se monitoreó durante 800 s y se desencadenó con el cambio de la solución de la muestra a HBS-EP+. La superficie del chip se regeneró después de cada ciclo mediante el uso de dos inyecciones de 10 mM de glicina, pH 2,1 durante 60 s. Las diferencias del índice de refracción crudo se corrigieron mediante la sustracción de la respuesta que se obtuvo en la celda de flujo 1 de referencia. Las constantes de afinidad se derivaron de las constantes de velocidad cinética mediante ajuste a una unión de Langmuir 1:1 con el uso del programa informático Biaeval (GE Healthcare). La medición se realizó por triplicado con series de dilución independientes.

Las siguientes muestras se analizaron para determinar la unión a Fc humano (P329G) (tabla 3).

Tabla 3: Descripción de las muestras analizadas para la unión a Fc humano (P329G).

Aglutinante	TAPIR ID	Formato
Anti-P329G (M-1.7.24) (parental)	P1AE9963	IgG, sobrenadante/purificada
Anti-P329G (VH3VL1)	P1AE9957	IgG, sobrenadante/purificada
Anti-P329G (VH1VL1)	P1AE9955	IgG, sobrenadante/purificada
Anti-P329G (VH2VL1)	P1AE9956	IgG, sobrenadante/purificada
Anti-P329G (VH4VL1)	P1AE9958	IgG, sobrenadante
Anti-P329G (VH1VL2)	P1AE9959	IgG, sobrenadante
Anti-P329G (VH1VL3)	P1AE9960	IgG, sobrenadante
Fc humano (P329G)	P1AD9000-004	Antígeno usado como analito

El Fc humano (P329G) se preparó mediante la digestión con plasmina de una IgG1 humana seguido de purificación por afinidad con ProteinA y cromatografía de exclusión por tamaño.

Unión de variantes parentales y de seis humanizaciones del aglutinante anti-P329G M-1.7.24 al Fc humano (P329G)

La fase de disociación se ajustó a una sola curva para ayudar a caracterizar la velocidad de inactividad. Se calculó la relación entre la unión y el nivel de respuesta de captura. (Tabla 4).

Tabla 4: Evaluación de la unión de seis variantes de humanización para la unión a Fc humano (P329G).

Aglutinante	TAPIR ID	kd (1/s)	Relación de unión/captura	Unión
Anti-P329G (M-1.7.24) (parental)	P1AE9963-001	5.73E-03	20	parental
Anti-P329G (VH3VL1)	P1AE9957-001	5.49E-03	20	como parental
Anti-P329G (VH1VL1)	P1AE9955-001	3.88E-03	20	como parental
Anti-P329G (VH2VL1)	P1AE9956-001	2.79E-03	23	como parental
Anti-P329G (VH4VL1)	P1AE9958-001	1.11E-02	19	reducido
Anti-P329G (VH1VL2)	P1AE9959-001	7.86E-03	10	reducido
Anti-P329G (VH1VL3)	P1AE9960-001	1.29E-01	3	reducido

Afinidad de variantes parentales y tres humanizaciones de aglutinante anti-P329G M-1.7.24 a Fc humano (P329G)

Se evaluaron con más detalle tres variantes de humanización con un patrón de unión similar al parental. Las constantes cinéticas para una unión de Langmuir 1:1 se resumen en la tabla 5.

Tabla 5: Constantes cinéticas (unión de Langmuir 1:1). Promedio y desviación estándar (en paréntesis) de triplicados independientes (series de diluciones independientes dentro de la misma corrida).

Aglutinante	TAPIR ID	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmáx (RU)
Anti-P329G (M-1.7.24) (parental)	P1AE9963-003	5.03E+05 (4,75 E+04)	1,58E-03 (3,8 E-05)	3.17E-09 (3,7 E-10)	44 (2)

Anti-P329G (VH3VL1)	P1AE9957-003	2.74E+05 (5,51 E+03)	1.44E-03 (7,51 E-05)	5.27E-09 (3,3 E-10)	55 (3)
Anti-P329G (VH1VL1)	P1AE9955-003	2.83E+05 (7,94 E+03)	1.20E-03 (4,73 E-05)	4.24E-09 (2,5 E-10)	48 (2)
Anti-P329G (VH2VL1)	P1AE9956-003	2.53E+05 (3,79 E+03)	1.22E-03 (3,61 E-05)	4.81E-09 (2,1 E-10)	54 (5)

Conclusión

Se generaron seis variantes de humanización. Tres de ellas (VH4VL1, VH1VL2, VH1VL3) mostraron una unión disminuida al Fc humano (P329G) en comparación con el M-1.7.24 parental. Las otras tres variantes de humanización (VH1VL1, VH2VL1, VH3VL1) tienen una cinética de unión muy similar a la del aglutinante parental y no perdieron afinidad por humanización.

Ejemplo 2

Preparación de receptores de unión al antígeno anti-P329G humanizados

A fin de evaluar la funcionalidad de las variantes de P329G humanizadas, los diferentes dominios variables de las secuencias de ADN de la cadena pesada (VH) y liviana (VL) que codifican un aglutinante específico para la mutación Fc P329G se clonaron como porciones de unión de fragmento variable monocatenario (scFv) y se usaron como dominio de unión al antígeno en un receptor de antígeno quimérico (CAR) de segunda generación.

Las diferentes variantes humanizadas del aglutinante P329G comprenden un dominio principal variable de la cadena pesada (VL) de Ig y un dominio variable de la cadena liviana (VL) de Ig. VH y VL se conectan mediante un ligador de (G4S)₄. El dominio de unión al antígeno scFv se fusionó al dominio transmembranario de anclaje (ATD) CD8a (Uniprot P01732[183- 203]), que se fusiona con un dominio de señalización coestimulador intracelular (CSD) CD137 (Uniprot Q07011AA 214-255), que, a su vez, se fusiona a un dominio de señalización estimulador (SSD) CD3ζ (Uniprot P20963 AA 52–164). El scFv del CAR anti-P329G se construyó en dos orientaciones diferentes VHxVL (figura 1 A) o VLxVH (figura 1B). Una representación gráfica de un constructo de expresión de ejemplo (que incluye el indicador GFP) para la configuración de VHVL se muestra en la figura 1C, y para la configuración de VLVH, en la figura 1D.

Ejemplo 3

Expresión de receptores de unión al antígeno anti-P329G en células Jurkat-NFAT

Los diferentes receptores de unión al antígeno anti-P329G humanizados se transdujeron viralmente en células Jurkat (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega #CS176501).

La expresión de receptores de unión al antígeno anti-P329G se evaluó mediante citometría de flujo. Las células Jurkat con diferentes receptores de unión al antígeno anti-P329G humanizados se recolectaron, se lavaron con PBS y se sembraron a 50.000 células por cavidad en una placa de fondo plano de 96 cavidades. Después de la tinción durante 45 min en la oscuridad y la refrigeración (4-8 °C) con diferentes concentraciones (dilución en serie 500 nM-0nM de 1:5) de anticuerpo que comprendía la mutación P329G en el dominio Fc, las muestras se lavaron tres veces con amortiguador de FACS (PBS que contenía FBS al 2 %, EDTA al 10 % 0,5 M, pH 8 y 0,5 g/l de NaN₃). Luego, las muestras se tiñeron con 2,5 µg/ml de anticuerpo de fragmento de cabra F (ab')₂ AffiniPure conjugado con PE y específico del fragmento Fcγ anti-IgG humana policlonal durante 30 min en la oscuridad en el refrigerador analizado con citometría de flujo (Fortessa BD). Asimismo, los receptores de unión al antígeno anti-P329G comprendían un indicador GFP intracelular (ver figura 1C).

En comparación con las versiones humanizadas (VH1VL1, VH2VL1 y VH3VL1) del aglutinante P329G, el aglutinante no humanizado original muestra etiquetado de CAR débil sobre la superficie celular (figura 2A), aunque la expresión de GFP es comparable. Resulta interesante que el constructo VL1VH1 (ver figura 1D) muestra alto nivel de expresión de GFP pero también etiquetado de CAR débil sobre la superficie celular, lo que indica que esto es una confirmación no favorable del aglutinante.

En términos generales, y de manera inesperada, la versión VH3VL1 muestra el mayor nivel de expresión de GFP y expresión de CAR en la superficie. Además, todos los constructos evaluados en la confirmación de VHVL (VH1VL1, VH2VL1 y VH3VL1) muestran señal de GFP mejorada después de la transducción en linfocitos T Jurkat en comparación con el receptor de unión al antígeno P329G no humanizado original y, curiosamente, el constructo en la confirmación de VLVH (VL1VH3).

En conclusión, la confirmación de VHVL parece favorecer los niveles de expresión de los receptores de unión al antígeno, así como el direccionamiento correcto a la superficie celular.

Para caracterizar aún más la selectividad, especificidad y seguridad de los receptores de unión al antígeno anti-P329G humanizados, se llevaron a cabo diferentes pruebas.

Ejemplo 4

Activación de linfocitos T específicos en presencia de anticuerpo de direccionamiento que comprende la mutación P329G en el dominio Fc

A fin de excluir la unión inespecífica de las diferentes variantes anti-P329G-scFv humanizadas, las células Jurkat NFAT que expresaban los receptores de unión al antígeno que comprendían estas variantes se evaluaron para determinar su activación en presencia de células diana WSUDLCL2 positivas para CD20 y anticuerpos anti-CD20 (GA101) con diferentes variantes de Fc (Fc de tipo silvestre, mutación P329G Fc, mutación LALA, mutación D246A o combinaciones de estas). El ensayo de activación de CAR-Jurkat NFAT se llevó a cabo como se describió anteriormente, e IgG1 de tipo silvestre anti-CD20 (GA101) (figura 3 A), IgG1 P329G LALA anti-CD20 (GA101) (figura 3 B), IgG1 LALA anti-CD20 (GA101) (figura 3 D), IgG1 D246A P329G anti-CD20 (GA101) (figura 3 F) o una IgG1 DP-47 P329G LALA no específica (figura 3 E) se usaron para evaluar el potencial de unión no específica. No se detectó activación de CAR anti-P329G inespecífica para IgG1 de tipo silvestre anti-CD20 (GA101) (figura 3 A), IgG1 LALA anti-CD20 (GA101) (figura 3 D) o la IgG1 DP-47 P329G LALA no específica (figura 3 E).

Se detectó activación de CAR anti-P329G específica en presencia de IgG1 P329G LALA anti-CD20 (GA101) (figura 3 B) e IgG1 D246A P329G anti-CD20 (GA101) (figura 3 F). La EC_{50} evaluada fue comparable entre todas las variantes anti-P329G humanizadas y no difirió de la EC_{50} del aglutinante original.

Resulta interesante que los receptores de unión al antígeno que comprenden aglutinantes de scFv en la conformación de VHVL llevan a una activación más fuerte de los linfocitos T Jurkat NFAT en comparación con el aglutinante no humanizado original y el aglutinante humanizado en la conformación de VLVH. La meseta más alta (ver, por ejemplo, la figura 3F) podría deberse a los niveles de expresión mejorados y/o al transporte mejorado a la superficie celular de los receptores de unión al antígeno que producen una activación más fuerte. Además, la conformación podría tener un impacto sobre la unión a la mutación P329G.

Para investigar el riesgo de agrupamiento potencial de dominios de unión al antígeno, que produce señalización tónica o activación inespecífica de los linfocitos T, el ensayo de activación de Jurkat NFAT se llevó a cabo como se describió anteriormente, mientras que la concentración de anticuerpo inicial usada se elevó, y la dilución en serie se inició con 100 nM de IgG1 GA101 P329G LALA, y además no se sembraron células diana.

Como se ilustra en la figura 3 C, ninguna activación fue detectable para todas las variantes de P329G humanizadas evaluadas, lo que indica agrupamiento de receptores detectable o activación inespecífica en ausencia de células diana.

Ejemplo 5

Sensibilidad de diferentes variantes de receptores de unión al antígeno P329G humanizados evaluados mediante activación de linfocitos T en células diana que expresan diferentes niveles de antígeno

Para caracterizar adicionalmente la sensibilidad y selectividad de los receptores de unión al antígeno anti-P329G humanizados, el ensayo de activación de Jurkat NFAT se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Las células indicadoras Jurkat NFAT que expresan los diferentes receptores de unión al antígeno de variantes anti-P329G-scFv humanizados se evaluaron para determinar su capacidad para discriminar entre células diana positivas para FolR1 en alto contenido (HeLa-FolR1), contenido medio (Skov3) y contenido bajo (HT29). Diferentes variantes del aglutinante anti-P329G se usaron como soporte de reconocimiento de antígenos de scFv en la línea de células Jurkat-indicadoras en combinación con anticuerpos que presenta afinidades altas (16D5) (figura 4 A, D, G), medias (16D5 W96Y) (figura 4 B, E, H) o bajas (16D5 G49S/K53A) (figura 4 C, F, I) a FolR1. Las células diana HeLa-FolR1 con alta expresión, combinadas con 16D5 anti-FolR1 con alta afinidad (figura 4 A), 16D5 W96Y anti-FolR1 con afinidad media (figura 4 B) y G49S K53A anti-FolR1 adaptador-IgG con baja afinidad (Figure 4 C) mostraron una activación dependiente de la dosis. Las células diana Skov3 de expresión media, combinadas con 16D5 anti-FolR1 con alta afinidad (figura 4 D), 16D5 W96Y anti-FolR1 con afinidad media (figura 4 E) y G49S K53A anti-FolR1 adaptador-IgG (figura 4 F) mostraron una activación dependiente de la dosis. Para las células diana HT29 de expresión baja, combinadas con el aglutinante con afinidad diferente 16D5 anti-FolR1 (figura 4 G), 16D5 W96Y anti-FolR1 (figura 4 H) o G49S K53A anti-FolR1 adaptador-IgG con baja afinidad (figura 4 I), no se detectó ninguna señal. Además, resulta interesante que los receptores de unión al antígeno en el formato VHVL producen mayor activación de los linfocitos T Jurkat NFAT en comparación con el aglutinante no humanizado original y el aglutinante humanizado en el formato VLVH. El aglutinante scFv de variante humanizada VH3VL1 produce la mayor intensidad de señal de todos los constructos (figura 4 A-F).

Además, el ensayo de activación de Jurkat NFAT se llevó a cabo en células HeLa (FolR1⁺ y HER2⁺) usadas en combinación con IgG1 16D5 P329G LALA anti-FolR1 (figura 5) o IgG1 P329G LALA anti-HER2 (figura 6). Ambos confirman el hallazgo de que la orientación VHVL es superior en comparación con la orientación VLVH. La variante humanizada VH3VL1 da lugar a la activación más fuerte de los linfocitos T Jurkat NFAT.

Ejemplo 6

Expresión de otros receptores de unión al antígeno anti-P329G en células Jurkat-NFAT

Un receptor de unión al antígeno anti-P329G humanizado de disulfuro se transdujo viralmente en células Jurkat (GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega #CS176501). La expresión de receptores de unión al antígeno anti-P329G se evaluó mediante citometría de flujo. Las células Jurkat que usan el receptor de unión al antígeno anti-P329G humanizado estabilizado mediante disulfuro se recolectaron, se lavaron con PBS y se sembraron a 50.000 células por cavidad en una placa de fondo plano de 96 cavidades. Después de la tinción durante 45 min en la oscuridad y la refrigeración (4-8 °C) con diferentes concentraciones (dilución en serie 600 nM-0nM de 1:10) de anticuerpo que comprendía la mutación P329G en el dominio Fc, las muestras se lavaron tres veces con amortiguador de FACS (PBS que contenía FBS al 2 %, EDTA al 10 % 0,5 M, pH 8 y 0,5 g/l de NaN₃). Luego, las muestras se tiñeron con 2,5 µg/ml de anticuerpo de fragmento de cabra F (ab')₂ AffiniPure conjugado con PE y específico del fragmento Fcγ anti-IgG humana policlonal durante 30 min en la oscuridad en el refrigerador y se analizaron con citometría de flujo (Fortessa BD). Asimismo, los receptores de unión al antígeno anti-P329G comprendían un indicador GFP intracelular (ver figura 1C). La expresión de CAR se normalizó a la señal de GFP.

En comparación con las versiones humanizadas VH3VL1 y VL1VH3, el aglutinante P329G estabilizado en disulfuro muestra etiquetado de CAR comparable en la superficie celular (figura 7).

Ejemplo 7

Expresión de otros receptores de unión al antígeno anti-P329G en linfocitos T HEK293

Para validar la expresión de los constructos de CAR HuR968B y HuR9684M, los linfocitos T 1.5x10⁶ HEK293 se sembraron en placas de 6 cavidades y se transfectaron después de 8-24 horas de período de adherencia, en donde la mezcla PEI (Polyscience, 24765)/cloruro de sodio (Baxter, A6E1307) contiene 2µm de CAR que codifica ADN de plásmido (1µg/µl). Después de un período de cultivo de 48h, el sobrenadante de cultivo HEK293T se descartó y las células HEK293T se analizaron para determinar la expresión de CAR con el uso de citometría de flujo. Por lo tanto, se transfirieron 3*10⁵ células HEK293T/por cavidad en una placa de 96 cavidades y se lavaron dos veces con amortiguador FACS (5 min, 300g). A medida que el anticuerpo primario Alexa Fluor 647-WT IgG o Alexa Fluor 647-PG IgG fue diluido en amortiguador FACS para obtener la solución 1:50 diluida. Las células HEK293T se suspendieron en esa solución de

anticuerpo y se tiñeron a 4 °C durante 30 min. Después del lavado con amortiguador FACS (5 min, 300g), las células se fijaron durante 20 min con el uso de solución Fixation al 3 % (Thermo Scientific Cat.: 28908). Las células se analizaron luego mediante citometría de flujo para etiquetado de GFP y APC. Ambas, CAR HuR968B y HuR9684M pudieron expresarse y detectarse exitosamente en linfocitos T HEK239 (figura 9).

Ejemplo 8

Expresión de otros receptores de unión al antígeno anti-P329G en linfocitos T

Los linfocitos T CAR se prepararon con transducción lentiviral y la expresión de CAR fue confirmada mediante citometría de flujo. Para la detección de CAR, se lavó una cantidad adecuada de linfocitos T transducidos con amortiguador FACS una vez, 300 × g, 5 min. Se agregaron el amortiguador FACS que contenía células muertas fijables LIVE/DEAD y AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG de Biotin-SP (espaciador largo) (Jackson ImmunoResearch, 109-066-006) y las células se tiñeron a 4 °C durante 30~45 min. Luego, las células se lavaron dos veces y se agregaron los anticuerpos respectivos: PerCP-Cy5.5-CD3 (BD, 560835), BUV805-CD8 (BD, 749366), estreptavidina APC (Biolegend, 405207) y se tiñeron a 4 °C durante 30~45 min. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con amortiguador FACS, se volvieron a suspender y se evaluaron con el uso de citometría de flujo. Los datos se analizaron usando *software* FlowJo. Después de la regulación en células CD3⁺ que se asemejan a la población de linfocitos T, el % de células positivas para CAR T se detectó como 27 % para HuR9684M y 18 % para HuR968B (figura 10B).

Ejemplo 9

Inactivación de linfocito T específica inducida por receptores de unión al antígeno anti-P329G de HuR968B y HuR9684M y A6 IgG que comprenden la mutación P329G

Los linfocitos T que expresan CAR HuR968B o HuR9684M se prepararon de un donante de sangre (PCH20201100004) y se compararon en un ensayo de inactivación con el uso de DAN-G18.2 como células diana y A6 PG IgG o WT A6 (VH/VL SEQ ID NO: 136/137 y mutación P329G en Fc, como por ejemplo, SEQ ID NO:55) para acoplar Claudin 18.2 en la superficie celular diana. Las células diana y efectoras se sembraron en una relación E:T=1:2 con 100ng/ml de PG IgG o WT IgG. La inactivación de células diana se midió con el uso de xCELLigence durante 60 h (figura 11A y B).

Aun en la presencia de P329G y el anticuerpo WT A6, las células UNT no transducidas no produjeron efecto de inactivación. Los linfocitos T CAR HuR968B y HuR9684M indujeron posible lisis de células tumorales, cuando se incuban con PG IgG (figura 11A). Si se incubaron con WT IgG de control, que carece de mutación de PG, no se observó inactivación celular (figura 11B).

Ejemplo 10**Inactivación de linfocito T específica inducida por receptor de unión al antígeno anti-P329G de HuR968B y A6 y Zmab IgG que comprende la mutación P329G**

Los linfocitos T HuR968B CAR se cocultivaron durante 24h en presencia de distintas concentraciones de anticuerpo de A6 PG IgG y Zmab PG IgG (VH/VL SEQ ID NO: 136/137 o 138/139 y mutación P329G en Fc, como por ejemplo, SEQ ID NO:55), en donde ambos actúan sobre Claudin 18.2. La relación E:T fue de 1:1. El ensayo se llevó a cabo en placas de fondo redondo de 96 cavidades y después de 24h el sobrenadante de las cavidades respectivas se observó para la liberación de LDH y la citotoxicidad se calculó de acuerdo con las sugerencias de los fabricantes (ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96 Promega G1780). Ambos PG IgG mostraron lisis de células diana de células diana DAN-G18.2 que expresan un alto nivel de Claudin 18.2 (figura 12).