

RECEPTORES DE ANTÍGENO MUC16 QUIMÉRICOS

APLICACIONES RELACIONADAS

La solicitud instantánea reivindica la prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos
5 núm. 63/298,141, presentada el 10 de enero de 2022. El contenido completo de la solicitud
anterior se incorpora expresamente como referencia en la presente descripción.

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a receptores de antígeno quiméricos (CAR) que comprenden
anticuerpos anti-MUC16 (mucina 16, superficie celular asociada) o fragmentos de unión a
10 antígeno de estos, células efectoras inmunitarias genéticamente modificadas para expresar estos
CAR, y uso de estas composiciones para tratar eficazmente tumores sólidos.

ANTECEDENTES

La mucina 16 (MUC16), también conocida como antígeno del cáncer 125 (CA-125) es un dominio
transmembrana único sobreexpresado en tumores sólidos, tales como cáncer de ovario. Se ha
15 demostrado que la expresión de MUC16 en células cancerosas protege a las células tumorales
del sistema inmunitario (Felder, M. y otros 2014, Molecular Cancer, 13:129). Aunque se han
investigado anticuerpos dirigidos a MUC16 (*p. ej.*, oregovomab y abgovomab), han tenido un éxito
clínico limitado. En consecuencia, se necesitan terapias adicionales dirigidas a este antígeno.

COMPENDIO

20 La presente descripción se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de receptores de
antígeno quimérico (CAR) específicos para un polipéptido MUC16. Específicamente, los CAR
descritos en la presente descripción son específicos para un fragmento o porción de MUC16
presente en la superficie de una célula después de la escisión proteolítica del polipéptido MUC16
de longitud completa. Como se demuestra en la presente descripción, los CAR anti-MUC16

descritos comprenden propiedades sorprendentes e inesperadas. Como se analizó con más detalle en los Ejemplos, los CAR de la descripción exhiben una fuerte actividad dependiente de antígeno evaluada mediante liberación de IFN-gamma, altas eficiencias de transducción y alta expresión (ver, *por ejemplo*, el Ejemplo 2). Además, los CAR anti-MUC16 descritos en la presente descripción muestran citotoxicidad dependiente del antígeno de maneras dependientes de la dosis, *por ejemplo*, al menos 60 %, al menos 65 % o al menos 70 % de citotoxicidad (Ejemplo 3). Además, ciertos CAR anti-MUC16 descritos en la presente descripción exhibieron una mayor expresión de marcadores, tales como CD62L y CD45RA (Ejemplo 4), lo que apunta a un fenotipo mayor sin tratamiento previo con potencial para una mayor persistencia *in vivo*. Finalmente, ciertos CAR anti-MUC16 probados en la presente descripción demostraron sorprendentemente una actividad antitumoral superior *in vivo* (Ejemplos 6 y 7), que incluye la reducción del número de células cancerosas que expresan MUC16 *in vivo*.

En consecuencia, en algunos aspectos, la presente descripción proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende: un dominio extracelular que comprende un anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este que se une a uno o más epítomos de un polipéptido MUC16 humano; un dominio transmembrana, uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular y un dominio de señalización primario. En algunos aspectos, el anticuerpo MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este se une a un fragmento proximal de membrana de MUC16 que permanece en la superficie celular después de la escisión proteolítica de un polipéptido MUC16 de longitud completa. En un aspecto, el fragmento de MUC16 que permanece en la superficie celular después de la escisión proteolítica comprende la SEQ ID NO: 151. En algunos aspectos, el polipéptido MUC16 de longitud completa comprende 16 dominios de espermatozoos de erizo de mar, enteroquinasa y agrina (SEA), numerados 1-16 desde el N-terminal hasta el C-terminal, y en donde el fragmento de MUC16 comprende los dominios SEA 12-16.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno que se une al polipéptido MUC16 humano se selecciona del grupo que consiste en: Fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un dímero Fab biespecífico (Fab₂), un trímero Fab trispecífico (Fab₃), un Fv, una proteína Fv de cadena única ("scFv"), un bis-scFv, (scFv)₂,
 5 un Camel Ig, un VHH, Ig NAR, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, una proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv"), y un anticuerpo de dominio único (sdAb, Nanocuerpo) o fragmento de este. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este que se une al polipéptido MUC16 humano es un scFv.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento
 10 de unión a antígeno de este comprende las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3 dentro de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3 dentro de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 47, 59, 71, 83, 95, 107, 119, 133 o
 15 145. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3 dentro de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3 dentro de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable como se
 20 establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 134 o 146. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende una o más CDR como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende una o más CDR como se establece en cualquiera de (a) SEQ ID NO: 41-43, (b) SEQ ID NO: 53-55, (c) SEQ ID

NO: 65-67, (d) SEQ ID NO: 77-79, (e) SEQ ID NO: 89-91, (f) SEQ ID NO: 101-103, (g) SEQ ID NO: 113-115, (h) SEQ ID NO: 127-129 o (i) SEQ ID NO: 139-141. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende una o más CDR como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-

5 MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de
cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo
anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos
de cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, el
anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende una o más CDR
10 como se establece en cualquiera de (a) SEQ ID NO: 44-46, (b) SEQ ID NO: 56-58, (c) SEQ ID
NO: 68-70, (d) SEQ ID NO: 80-82, (e) SEQ ID NO: 92-94, (f) SEQ ID NO: 104-106, (g) SEQ ID
NO: 116-118, (h) SEQ ID NO: 130-132 o (i) SEQ ID NO: 142-144.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con, o comprende la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad o comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 47, 59, 71, 83, 95, 107, 119, 133 o 145. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con, o comprende la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con, o comprende la SEQ ID NO: 9.

93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad o comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 134 o 146.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el dominio transmembrana es de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154, y PD1. En algunos aspectos, el dominio transmembrana es de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8α, CD4, CD45, PD1 y CD154. En algunos aspectos, el dominio transmembrana es de CD8α. En algunos aspectos, el dominio transmembrana comprende una secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 154. En una modalidad, el dominio transmembrana comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 154. En una modalidad, el dominio transmembrana comprende la SEQ ID NO: 154.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el uno o más dominios de señalización coestimuladora son de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, y ZAP70. En algunos aspectos, el uno o más dominios de señalización coestimuladores son de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137 (4-1BB). En algunos aspectos, el uno o más dominios de señalización coestimuladores son de CD137 (4-1BB). En algunos aspectos, el dominio de señalización coestimuladora comprende una secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 155. En una modalidad, el dominio de

señalización coestimuladora comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 155. En una modalidad, el dominio de señalización coestimuladora comprende la SEQ ID NO: 155.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el dominio de señalización principal es de CD3 ζ . En algunos aspectos, el dominio de señalización principal comprende una secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 156. En una modalidad, el dominio de señalización principal comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 156. En una modalidad, el dominio de señalización principal comprende la SEQ ID NO: 156.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende un polipéptido de región de bisagra. En algunos aspectos, el polipéptido de la región de bisagra comprende una región de bisagra de CD8 α . En algunos aspectos, el polipéptido de región de bisagra comprende una secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 153. En una modalidad, el polipéptido de región de bisagra comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 153. En una modalidad, el polipéptido de la región de bisagra comprende la SEQ ID NO: 153.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende un péptido señal. En algunos aspectos, el péptido señal comprende un polipéptido señal de cadena pesada IgG1, polipéptido señal del receptor 2 del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSFR2), polipéptido señal Igk o un polipéptido señal CD8 α . En algunos aspectos, el polipéptido señal comprende un polipéptido señal CD8 α . En algunos aspectos, el polipéptido señal comprende una secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 154. En una modalidad, el polipéptido señal comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 154. En una modalidad, el polipéptido señal comprende la SEQ ID NO: 154.

97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 152. En una modalidad, el polipéptido señal comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 152. En una modalidad, el polipéptido señal comprende la SEQ ID NO: 152.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende además un primer

5 enlazador polipeptídico entre los dominios de cadena pesada variable y de cadena ligera variable.

En algunos aspectos, el enlazador polipeptídico entre los dominios de cadena pesada variable y de cadena ligera variable comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en

cualquiera de las SEQ ID NO: 14-25. En modalidades particulares, el enlazador polipeptídico entre los dominios de cadena pesada variable y de cadena ligera variable comprende un

10 enlazador de aminoácidos 3xG4S como se establece en la SEQ ID NO: 24.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende además un segundo enlazador polipeptídico entre el dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular. En algunos aspectos, el enlazador polipeptídico entre el dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular comprende la

15 secuencia de LYC.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3 dentro de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 7 y las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3 dentro de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada

20 variable como se establece en la SEQ ID NO: 8; el dominio transmembrana es de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8 α , CD4, CD45, PD1 y CD154; el uno o más dominios de señalización coestimuladores son de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137 (4-1BB); y el dominio de señalización principal es de CD3 ζ .

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este comprende las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3 dentro de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 7 y las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3 dentro de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 8; el dominio transmembrana es de CD8 α ; el uno o más dominios de señalización coestimuladores son de CD137 (4-1BB); y el dominio de señalización principal es de CD3 ζ .

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o que comprende la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos, el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad o que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 73, 74, 75, 76, 85, 86, 87, 88, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 135, 136, 137, 138, 147, 148, 149 o 150.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un CAR que compite por unirse a uno o más epítomos de un polipéptido MUC16 humano con un CAR descrito en la presente descripción.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un polinucleótido que codifica un CAR descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, la secuencia de polinucleótidos que codifica el CAR se expone en la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la descripción proporciona un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la descripción proporciona un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la secuencia de polinucleótidos codifica un polipéptido que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o que comprende la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11.

92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 9, 11, 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 73, 74, 75, 76, 85, 86, 87, 88, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 135, 136, 137, 138, 147, 148, 149 o 150.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un vector que comprende un polinucleótido

5 descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, el vector es un vector de expresión. En algunos aspectos, el vector es un vector episomal. En algunos aspectos, el vector es un vector viral. En algunos aspectos, el vector es un vector retroviral. En algunos aspectos, el vector es un vector lentiviral. En algunos aspectos, el vector lentivírico se selecciona del grupo que consiste en: virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1); virus de inmunodeficiencia humana 2 (HIV-2),
10 virus visna-maedi (VMV); virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV); virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); virus de inmunodeficiencia felina (FIV); virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV). En algunos aspectos, el vector es un vector viral adenoasociado.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el vector comprende una LTR retroviral
15 izquierda (5'), una señal de empaquetamiento de Psi (Ψ), una aleta de ADN/trayecto de polipurina central (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral; un promotor unido operativamente a un polinucleótido descrito en la presente descripción; y una LTR retroviral derecha (3'). En algunos aspectos, el vector comprende una secuencia de poliadenilación heteróloga. En algunos aspectos, el promotor de la LTR 5' se reemplaza con un promotor heterólogo. En algunos
20 aspectos, el promotor heterólogo es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de virus del sarcoma rojo (RSV) o un promotor de virus simio 40 (SV40). En algunos aspectos, la LTR 5' o la LTR 3' es una LTR de lentivirus. En algunos aspectos, la LTR 3' comprende una o más modificaciones. En algunos aspectos, la LTR 3' comprende una o más delecciones. En algunos aspectos, la LTR 3' es una LTR autoinactivable (SIN). En algunos aspectos, el promotor unido

operativamente a un polinucleótido descrito en la presente descripción se selecciona del grupo que consiste en: un promotor génico temprano inmediato (CMV) de citomegalovirus, un promotor alfa del factor de alargamiento 1 (EF1- α), un promotor de fosfoglicerato cinasa-1 (PGK), un promotor de ubiquitina-C (UBQ-C), un potenciador de citomegalovirus/promotor de beta-actina de pollo (CAG), potenciador del poliovirus/promotor de la timidina cinasa simple de las hierbas (MC1), un promotor de beta actina (β -ACT), un promotor del virus simio 40 (SV40), y un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, región de control negativo eliminada, promotor sustituido por sitio de unión al cebador (MND) dl587rev. En algunos aspectos, el promotor unido operativamente a un polinucleótido descrito en la presente descripción es un promotor de MND.

- 10 En algunos aspectos, la descripción proporciona una célula que comprende un vector descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, la descripción proporciona una célula que comprende un CAR descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la célula es una célula efectora inmunitaria. En algunos aspectos, la célula efectora inmune es un linfocito T citotóxico (CTL), un linfocito infiltrante de tumor (TIL) o una célula T auxiliar. En algunos aspectos,
- 15 la célula es una célula T. En algunos aspectos, la célula es una célula T $\alpha\beta$, una célula T $\gamma\delta$, una célula asesina natural (NK) o una célula T asesina natural (NKT).

En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición que comprende una célula descrita en la presente descripción. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula descrita en la presente descripción y un

20 excipiente fisiológicamente aceptable.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un método para generar una célula efectora inmunitaria que comprende un CAR descrito en la presente descripción que comprende introducir en una célula efectora inmunitaria un polinucleótido o vector descrito en la presente descripción. En algunos aspectos, la descripción proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto

que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición descrita en la presente descripción. En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer sólido, opcionalmente en donde el cáncer sólido expresa MUC16. En algunos aspectos, el cáncer sólido se selecciona del grupo que consiste en sarcoma, cáncer de próstata, cáncer de útero, 5 cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cervical, mesotelioma, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de endometrio, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer bucal, colangiocarcinoma, cáncer de mama, y cáncer de vejiga. En algunos 10 aspectos, el cáncer sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, mesotelioma, NSCLC y SCLC. En algunos aspectos, el cáncer sólido es cáncer de ovario.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la composición se administra en combinación con un agente terapéutico adicional.

15 En algunos aspectos, la descripción proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto que ha recibido o recibe un agente terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición descrita en la presente descripción.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la composición y el agente terapéutico se administran secuencial o simultáneamente.

20 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el agente terapéutico es un inhibidor del punto de control inmunitario, virus oncolítico o anticuerpo coestimulador. En algunos aspectos, el inhibidor del punto de control inmunitario se une a una proteína del punto de control o ligando correspondiente seleccionado del grupo que consiste en: proteína de muerte celular programada 1 (PD-1; PDCD1), proteína del gen 3 de activación linfocitaria (LAG-3), Dominio de

inmunoglobulina de células T y proteína 3 del dominio de mucina (TIM-3), antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), atenuador de linfocitos T de banda (BTLA), receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR), Dominio de motivo inhibidor basado en tirosina (TIGIT) de inmunoglobulina de células T e inmunorreceptor Supresor de la activación de células

5 T en el dominio V Ig (VISTA), receptor similar a inmunoglobulina (KIR) de células asesinas, ICOS, ICOSL, OX40, B7-H3, B7-H4, CD47, 4-1BB, CD27, y CD70. En algunos aspectos, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de PD-1 o un inhibidor de PD-L1. En algunos aspectos, el inhibidor de PD-1 o el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 o un fragmento de unión al antígeno de este. En algunos aspectos, el inhibidor de PD-1 se
10 selecciona del grupo que consiste en: nivolumab, pembrolizumab, y cemiplimab.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el anticuerpo coestimulador es un anticuerpo biespecífico. En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico se une a un antígeno asociado al tumor (TAA) y CD3. En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico se une a un TAA y CD28. En algunos aspectos, el TAA se selecciona del grupo que consiste en AFP, ALK,

15 proteínas BAGE, β -catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, anhidrasa carbonosa IX, caspase-8, CCR5, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, cyclin-B1, CYP1B1, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, Proteínas GAGE (p. ej., GAGE-1, -2), GD2, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERC, LMP2, MART-1, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-
20 1, PRLR, Proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, survivin, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, tirosinasa, uroplaca-3, receptor de folato alfa (FR α), integrina $\alpha\beta$ 6, Antígeno de maduración de células B (BCMA), B7-H3 (CD276), B7-H6, anhidrasa carbonosa IX (CAIX), CCR1, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD133, CD135 (también conocido como

tirosina cinasa similar a fmc 3; FLT3), CD138, CD171, antígeno carcinoembrionario (CEA), Claudin-6 (CLDN6), Molécula similar a la lectina tipo C 1 (CLL-1), Subconjunto 1 de CD2 (CS-1), sulfato de condroitina proteoglicano 4 (CSPG4), antígeno 1 asociado al linfoma de células T cutáneas (CTAGE1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII), glicoproteína epitelial 2 (EGP2), glicoproteína epitelial 40 (EGP40), molécula de adhesión celular epitelial (EPCAM), receptor 2 de efrina tipo A (EPHA2), proteína de activación de fibroblastos (FAP), Receptor de Fc tipo 5 (FCRL5), receptor de acetilcolinesterasa fetal (AChR), ganglida G2 (GD2), G3 del ganglioide (GD3), Glypican-3 (GPC3), Familia de EGFR, incluido ErbB2 (HER2), IL-11R α , IL-13R α 2, Kappa,

5 cáncer/antígeno 2 del testículo (LAGE-1A), Lambda, Lewis-Y (Ley), Molécula de adhesión celular L1 (L1-CAM), miembro 2 de la subfamilia B del receptor similar a la inmunoglobulina leucocitaria (LILRB2); gen del antígeno del melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGEA10, antígeno de melanoma reconocido por las células T 1 (MelanA o MART1), Mesotelina (MSLN), molécula de adhesión celular neuronal (NCAM), cáncer/antígeno 1 del testículo (NY-

10 ESO-1), ácido polisálico; Específico para placenta 1 (PLAC1), antígeno expresado preferentemente en melanoma (PRAME), antígeno de células madre prostáticas (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor receptor similar a tirosina cinasa receptor huérfano 1 (ROR1), sarcoma sinovial, X punto de interrupción 2 (SSX2), glicoproteína

15 72 asociada a tumor (TAG72), Inmunoglobulina de linfocitos T y dominio mucínico que contiene

20 3 (TIM-3), marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248), relacionado con el marcador endotelial tumoral 7 (TEM7R), trofoblastos glicoproteína (TPBG), Ligandos NKG2D, receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), y tumor de Wilms 1 (WT-1). En algunos aspectos, el TAA es MSLN. En algunos aspectos, el TAA es un receptor de folato alfa (FR α). En algunos aspectos, el TAA es MUC16.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el agente terapéutico es un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En una modalidad, el inhibidor de VEGF es bevacizumab. En una modalidad, el agente terapéutico es una citocina. En una modalidad, la citocina es IL-2 o IL-2 enmascarada. En una modalidad, el agente terapéutico es un virus oncolítico. En algunas modalidades, el virus oncolítico se selecciona del grupo que consiste en VSV (Voyager V1), HSV, adenovirus, virus de la maraba, virus del sarampión, NDV, picornavirus, reovirus o virus de la vaccinia. En una modalidad, el virus oncolítico es Voyager V1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es un esquema del polipéptido MUC16.

10 La **Figura 2** es un gráfico que muestra el número de copias del vector (VCN) de células T donantes sanos transducidas con cada uno de los vectores CAR MUC16 mostrados.

La **Figura 3** es un gráfico que muestra la expresión de CAR en células T donantes sanos transducidas con cada uno de los vectores CAR MUC16 mostrados.

La **Figura 4A** es un gráfico que muestra la liberación de IFN γ de las células T CAR MUC16.

15 La **Figura 4B** es un gráfico que muestra la liberación de IFN γ de las células T CAR MUC16 cultivadas conjuntamente en presencia de células OVCAR3 que expresan MUC16.

La **Figura 4C** es un gráfico que muestra la liberación de IFN γ de las células T CAR MUC16 cultivadas conjuntamente en presencia de células Jurkat que no expresan MUC16.

20 La **Figura 4D** es un gráfico que muestra la liberación de IFN γ de las células T CAR MUC16 cultivadas conjuntamente en presencia de células PANC-1 que no expresan MUC16.

La **Figura 5** muestra la liberación de IFN γ de las células T CAR MUC16 cultivadas conjuntamente en presencia de líneas celulares tumorales negativas para antígeno (Jurkat, PANC-1, HUH7, K562, A549 e RD)

La **Figura 6A** muestra la expresión del ectodominio MUC16 en células RD que estabilizan la

expresión de niveles altos, medios o bajos del ectodominio MUC16.

La **Figura 6B** muestra la liberación de IFN γ de las células T CAR MUC16 cocultivas con células RD que se estabilizan expresando niveles altos, medios o bajos del ectodominio MUC16.

La **Figura 7A** muestra el número de copias de ARNm desnudo de MUC16 en células tumorales K562 electroporadas con cantidades ajustadas de ARNm desnudo de MUC16.

La **Figura 7B** muestra la liberación de IFN γ de las células T CAR MUC16 cultivadas junto con las células tumorales K562 que expresan cantidades ajustadas de ARNm de desnudo de MUC16 electroporado.

La **Figura 8A** muestra la citotoxicidad de las células T CAR MUC16 cocultivas con células RD que se estabilizan expresando niveles altos, medios o bajos del ectodominio MUC16, a relaciones de 10:1, 5:1 y 2.5:1 efector a células T (E:T).

La **Figura 8B** muestra la citotoxicidad de las células T MUC16 CAR co-cultivadas con células RD estabilizadas que expresan niveles altos, medios o bajos del ectodominio MUC16, en una relación 2.5:1 de efector a células T (E:T).

La **Figura 9** muestra el análisis de marcadores fenotípicos mediante citometría de flujo de células T CAR MUC16.

Las **Figuras 10A y 10B** proporcionan gráficos que muestran la producción de IFN γ por células que expresan CAR anti-MUC16 cultivadas en presencia de ectodominio MUC16-nub (**Figura 10A**) o CA125 (**Figura 10B**).

La **Figura 11** es un gráfico que muestra la reducción de células tumorales OVCAR3.FP que expresan MUC16 y luciferasa, como se muestra por la reducción en la expresión de luciferasa. 14 días después de inocular ratones con células OVCAR3.FP, los ratones tratados con células T CAR anti-MUC16 mostraron una reducción en luciferasa. Los ratones se volvieron a exponer con células tumorales OVCAR3.FP 28 días después de administrar las células T CAR anti-MUC16, y

las células tumorales se redujeron lo que indica persistencia de las células T CAR anti-MUC16. Los controles fueron células no transducidas (UTD), ratones no tratados (OVCAR3.FP) y células transducidas solo con vehículo (Vehículo).

Las **Figuras 12A, 12B y 12C** muestran la actividad antitumoral de las células T CAR MUC16 transducidas con los constructos CAR anti-MUC16 indicados en ratones NGS inoculados con células tumorales OVCAR3.

Las **Figuras 13A, 13B y 13C** muestran actividad antitumoral de las células T CAR MUC16 transducidas con las construcciones de CAR anti-MUC16 indicadas en un modelo de tumor IP OVCAR3.FP.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS IDENTIFICADORES DE SECUENCIA**

SEQ ID NOs: 1-33 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 4-6 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

15 **SEQ ID NO: 7** expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 8 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

20 **SEQ ID NO: 9** expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 10 expone una secuencia de nucleótidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 11 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 12 expone una secuencia de nucleótidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo contemplado en la presente descripción.

5 **SEQ ID NO: 13** expone la secuencia de aminoácidos de MUC16 humano.

SEQ ID NO: 14-25 exponen secuencias de aminoácidos de enlazadores ilustrativos adecuados para su uso en los CAR anti-MUC16 contemplados en la presente descripción.

SEQ ID NO: 26-35 exponen secuencias de aminoácidos de sitios de escisión ilustrativos 2A.

SEQ ID NO: 36-38 exponen secuencias de aminoácidos de sitios de escisión ilustrativos.

10 **SEQ ID NO: 39** expone la secuencia de aminoácidos de un fragmento MUC16 humano después de la escisión proteolítica que comprende una etiqueta myc-myc-his.

SEQ ID NO: 40 expone la secuencia de aminoácidos de MUC16 humano que carece del antígeno de ectodominio desnudo (CA125).

15 **SEQ ID NO: 41-43** exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 44-46 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

20 **SEQ ID NO: 47** expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 48 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 49 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que

carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 50 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 51 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 52 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 53-55 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 56-58 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 59 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 60 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 61 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 62 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 63 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 64 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que

incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 65-67 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 68-70 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 71 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 72 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 73 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 74 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 75 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 76 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 77-79 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 80-82 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 83 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera

ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 84 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 85 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 86 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 87 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 88 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 89-91 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 92-94 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 95 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 96 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 97 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que

carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 98 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

5 **SEQ ID NO: 99** expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 100 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 101-103 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

10 **SEQ ID NO: 104-106** exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 107 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

15 **SEQ ID NO: 108** expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 109 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

20 **SEQ ID NO: 110** expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 111 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 112 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que

incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 113-115 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 116-118 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 119 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 120 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 121 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 122 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 123 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 124 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 125 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 126 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 127-129 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera ilustrativas

de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 130-132 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 133 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera

5 ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 134 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

10 **SEQ ID NO: 135** expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 136 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

15 **SEQ ID NO: 137** expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 138 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 139-141 exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

20 **SEQ ID NO: 142-144** exponen secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada ilustrativas de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 145 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 146 expone una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada ilustrativa de un scFv anti-MUC16 para un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción.

5 **SEQ ID NO: 147** expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 148 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 149 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que carece de un péptido señal contemplado en la presente descripción.

10 **SEQ ID NO: 150** expone una secuencia de aminoácidos de un CAR anti-MUC16 ilustrativo que incluye un péptido señal contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 151 expone la secuencia de aminoácidos de un fragmento MUC16 humano después de la escisión proteolítica que carece de una etiqueta myc-myc-his.

15 **SEQ ID NO: 152** expone la secuencia de aminoácidos de un péptido señal ilustrativo contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 153 expone la secuencia de aminoácidos de un péptido ilustrativo de la región de bisagra contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 154 expone la secuencia de aminoácidos de un péptido ilustrativo de la región transmembrana contemplado en la presente descripción.

20 **SEQ ID NO: 155** expone la secuencia de aminoácidos de un péptido coestimulador ilustrativo contemplado en la presente descripción.

SEQ ID NO: 156 expone la secuencia de aminoácidos de un péptido ilustrativo de la región de señalización contemplado en la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A. Descripción general

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona receptores de antígeno quimérico (CAR) que comprenden un dominio de unión para MUC16. MUC16, también conocido como antígeno 125 del cáncer, antígeno 125 del carcinoma, antígeno 125 del carbohidrato o CA-125, es una glicoproteína de membrana integral altamente glicosilada. MUC16 se sobreexpresa en cánceres, incluidos cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, tipo formador de la masa del colangiocarcinoma intrahepático, adenocarcinoma del útero y adenocarcinoma del tracto gástrico, y en enfermedades y afecciones, como enfermedad inflamatoria intestinal, cirrosis hepática, insuficiencia cardíaca, infección peritoneal y cirugía abdominal. (Haridas, D. y otro+s, 2014, FASEB J., 28:4183-4199), y se ha demostrado que la expresión de MUC16 en células cancerosas protege a las células cancerosas del sistema inmunológico (Felder, M. y otros, 2014, Molecular Cancer, 13:129). En algunas modalidades, las células efectoras inmunitarias que expresan CAR que comprenden un dominio de unión a MUC16 muestran sorprendentemente una mayor respuesta inmunitaria y citotoxicidad en comparación con las células efectoras no transducidas cuando se cocultivan con células cancerosas.

MUC16 comprende un único dominio transmembrana que consiste en tres dominios principales: un dominio N-terminal extracelular, un dominio repetido en tándem grande intercalado con los dominios de espermatozoos de erizo de mar, enteroquinasa y agrina (SEA), y un dominio terminal carboxilo que comprende un segmento de la región transmembrana y una cola citoplasmática corta. La **Figura 1** proporciona un esquema que muestra los dominios de MUC16. Tras la escisión proteolítica de MUC16, la mayor parte de la porción extracelular se libera en el torrente sanguíneo. Un fragmento de MUC16 permanece en la superficie de la célula. En algunas modalidades, MUC16 comprende 16 dominios SEA en el C-terminal del polipéptido, numerados

de 1 a 16 desde el N-terminal hasta el C-terminal. En algunas modalidades, el fragmento MUC16 que permanece en la superficie de la célula comprende los dominios SEA 12-16. En algunas modalidades, los CAR descritos en la presente descripción se unen selectivamente a los dominios SEA 12-16 de MUC16. En algunas modalidades, los CAR descritos en la presente descripción no se unen a los dominios SEA 1-11 de MUC16.

Técnicas para recombinante (*es decir*, ADN modificado genéticamente), síntesis de péptidos y oligonucleótidos, inmunoensayos, cultivo de tejidos, transformación (*p. ej.*, electroporación, lipofección), reacciones enzimáticas, la purificación y las técnicas y procedimientos relacionados pueden realizarse generalmente como se describe en varias referencias generales y más específicas en microbiología, biología molecular, la bioquímica, genética molecular, biología celular, virología e inmunología como se mencionó y analizó a lo largo de la presente descripción.

Ver, por ejemplo, Sambrook, y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3da ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, actualizado en julio de 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I y II (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985); *Current Protocols in Immunology* (Editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, editado por Julie Logan, Kirstin Edwards y Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK; Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie y Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., 1984); *Nucleic Acid The Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R.

Freshney, Ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Next-Generation Genome Sequencing* (Janitz, 2008 Wiley-VCH); *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Park, Ed., 3ra edición, 2010 Humana Press); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow y Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV (D. M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986); Roitt, *Essential Immunology*, 6a edición, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); *Current Protocols in Immunology* (Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; así como monografías en revistas como *Advances in Immunology*.

B. Definiciones

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción puede usarse en la práctica o prueba de modalidades particulares, las modalidades preferidas de composiciones, métodos y materiales se describen en la presente descripción. Para los propósitos de la presente descripción, los siguientes términos se definen a continuación.

Los artículos "un", "una" y "el/la" se usan en la presente descripción para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno, o a uno o más) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o uno o más elementos.

Debe entenderse que el uso de la alternativa (por ejemplo, "o") significa una, ambas o cualquiera

de sus combinaciones de alternativas.

Debe entenderse que el término "y/o" significa una o ambas alternativas.

Como se usa en la presente, el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta en un 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En una modalidad, el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a un intervalo de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud $\pm 15 \%$, $\pm 10 \%$, $\pm 9 \%$, $\pm 8 \%$, $\pm 7 \%$, $\pm 6 \%$, $\pm 5 \%$, $\pm 4 \%$, $\pm 3 \%$, $\pm 2 \%$ o $\pm 1 \%$ sobre una cantidad de referencia, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud.

En algunas modalidades, un intervalo, *por ejemplo*, 1 a 5, aproximadamente 1 a 5, o aproximadamente 1 a aproximadamente 5, se refiere a cada valor numérico abarcado por el intervalo. Por ejemplo, en una modalidad no limitante y simplemente ilustrativa, el intervalo "1 a 5" es equivalente a la expresión 1, 2, 3, 4, 5; o 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, o 5.0; o 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, o 5.0.

Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que es 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superior en comparación con una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En una modalidad, "sustancialmente la misma" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que produce un efecto, *por ejemplo*, un efecto fisiológico, que es aproximadamente el

mismo que una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

A lo largo de esta descripción, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o

5 elemento o grupo de etapas o elementos declarados pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se entiende incluir cualquier elemento
10 enumerado después de la frase, y limitado a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que no hay otros elementos presentes que afecten materialmente la actividad o acción de los elementos enumerados.

15 La referencia a lo largo de esta descripción a "una modalidad", "una modalidad particular", "una modalidad relacionada", "una modalidad determinada", "una modalidad adicional" o "otra modalidad" o sus combinaciones significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con la modalidad se incluye en al menos una modalidad. Por lo tanto, la aparición de las frases anteriores en varios lugares a lo largo de esta descripción no
20 necesariamente se refiere a la misma modalidad. Además, las características, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más modalidades. También se entiende que la mención positiva de un elemento en una modalidad, sirve como base para excluir el elemento en una modalidad particular.

C. Receptores de antígenos quiméricos

En algunas modalidades, se proporcionan receptores modificados genéticamente mejorados que redirige la citotoxicidad de las células efectoras inmunitarias hacia las células que expresan MUC16. Estos receptores modificados genéticamente se denominan en la presente descripción receptores de antígeno quimérico (CAR). Los CAR son moléculas que combinan la especificidad
5 basada en anticuerpos para un antígeno deseado (p. ej., MUC16) con un dominio intracelular que activa el receptor de células T para generar una proteína quimérica que exhibe una actividad inmune celular anti-MUC16 específica. Como se usa en la presente, el término "quimérico" describe que se compone de partes de diferentes proteínas o ADN de diferentes orígenes.

En algunas modalidades, los CAR contemplados en el presente documento comprenden un
10 dominio extracelular (también denominado dominio de unión o dominio de unión específico de antígeno) que se une a MUC16, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El acoplamiento del dominio de unión a antígeno anti-MUC16 del CAR con MUC16 en la superficie de una célula diana resulta en la agrupación del CAR y suministra un estímulo de activación a la célula que contiene CAR. La principal característica de los CAR es su capacidad
15 para redirigir la especificidad de la célula efectora inmunitaria, lo que desencadena de esta manera la proliferación, la producción de citocinas, la fagocitosis o la producción de moléculas que pueden mediar la muerte celular del antígeno diana que expresa la célula de una manera independiente de la histocompatibilidad principal (MHC), explotando las capacidades de direccionamiento específicas de la célula de los anticuerpos monoclonales, ligandos solubles o
20 correceptores específicos de la célula.

En algunas modalidades, un CAR comprende un dominio de unión extracelular que comprende un dominio anti-MUC16-specific humano; un dominio transmembrana; uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular; y un dominio de señalización primario.

En algunas modalidades, un CAR comprende un dominio de unión extracelular que comprende

un anticuerpo anti-MUC16 humano o fragmento de unión a antígeno de este; uno o más dominios bisagra o dominios espaciadores; un dominio transmembrana; uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular; y un dominio de señalización primario.

1. Dominio de unión

- 5 En algunas modalidades, los CAR contemplados en la presente descripción comprenden un dominio de unión extracelular que comprende un anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este que se une específicamente a un polipéptido MUC16 humano expresado en una célula diana (*por ejemplo*, células cancerosas). El término "MUC16", como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína MUC16 humana, a menos que se especifique que es de
- 10 una especie no humana (*por ejemplo*, "MUC16 de ratón", "MUC16 de mono", etc.). MUC16 comprende tres dominios principales: un dominio N-terminal extracelular, un dominio repetido en tándem grande intercalado con esperma de erizo de mar, enteroquinasa, dominios de agrina (SEA) y un dominio carboxilo terminal que comprende un segmento de la región transmembrana y una cola citoplasmática corta. La proteína MUC16 humana tiene la secuencia de aminoácidos
- 15 mostrada en la SEQ ID NO:13, y/o que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en el acceso NCBI núm. NP_078966. El dominio proximal de membrana MUC16 humano (P13810-P14451) (MUC16 "nub") que tiene una etiqueta myc-myc-his se muestra como la SEQ ID NO: 39. El dominio proximal de membrana MUC16 humano (P13810-P14451) (MUC16 "nub") que carece de una etiqueta myc-myc-his se muestra como la SEQ ID NO: 151. El término "CA125", como se
- 20 usa en la presente descripción, se refiere al polipéptido MUC16 humano que carece del dominio proximal de membrana MUC16 (MUC16 "nub") como se muestra como la SEQ ID NO: 40.
- Los términos "MUC16-nub", "nub", "ectodominio MUC16", "ectodominio MUC16-nub" y "ectodominio" como se usan en la presente descripción son intercambiables y se refieren a un dominio o fragmento del polipéptido MUC16 proximal de membrana que permanece en la

superficie celular después de la escisión. En algunas modalidades, el ectodominio MUC16-nub comprende los dominios SEA 12-16.

Como se usan en el presente documento, los términos "dominio de unión", "dominio extracelular", "dominio de unión extracelular", "dominio de unión específico de antígeno" y "dominio de unión específico de antígeno extracelular" se usan indistintamente y proporcionan un CAR con la capacidad para unirse específicamente al antígeno diana de interés, por ejemplo, MUC16. El dominio de fijación puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. Los términos "afinidad de unión específica" o "se une específicamente" o "se une específicamente" o "unión específica" o "objetivos específicos" como se usan en el presente documento, describen la unión de un anticuerpo anti-MUC16 o un fragmento de unión a antígeno del mismo (o un CAR que comprende el igual) a MUC16 con mayor afinidad de unión que la unión de fondo. Un dominio de unión (o un CAR que comprende un dominio de unión o una proteína de fusión que contiene un dominio de unión) "se une específicamente" a un MUC16 si se une o se asocia con MUC16 con una afinidad o K_a (es decir, una constante de asociación de equilibrio de una determinada interacción de unión con unidades de $1/M$) de, por ejemplo, mayor o igual a aproximadamente $10^5 M^{-1}$. En ciertas modalidades, un dominio de unión (o una proteína de fusión del mismo) se une a una diana con una K_a mayor o igual a alrededor de $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$, o $10^{13} M^{-1}$. Los dominios de unión de "alta afinidad" (o proteínas de fusión de cadena única de los mismos) se refieren a aquellos dominios de unión con una K_a de al menos $10^7 M^{-1}$, al menos $10^8 M^{-1}$, al menos $10^9 M^{-1}$, al menos $10^{10} M^{-1}$, al menos $10^{11} M^{-1}$, al menos $10^{12} M^{-1}$, al menos $10^{13} M^{-1}$ o mayor.

Alternativamente, la afinidad puede definirse como una constante de disociación de equilibrio (K_d) de una interacción de unión particular con unidades de M (por ejemplo, $10^{-5} M$ a $10^{-13} M$, o menos). Las afinidades de los polipéptidos del dominio de unión y proteínas CAR de acuerdo con

la presente descripción pueden determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, mediante ELISA competitivo (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), o mediante asociación de unión, o ensayos de desplazamiento mediante el uso de ligandos marcados, o mediante el uso de un dispositivo de resonancia de plasmones superficiales tal como el Biacore T100, que está disponible en Biacore, Inc., Piscataway, NJ o tecnología de biosensor óptico como el sistema EPIC o EnSpire que están disponibles en Corning y Perkin Elmer respectivamente (ver también, por ejemplo, Scatchard y otros (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; y las patentes de Estados Unidos núms. 5,283,173; 5,468,614, o el equivalente).

En algunas modalidades, la afinidad de la unión específica es alrededor de 2 veces mayor que la unión de fondo, alrededor de 5 veces mayor que la unión de fondo, alrededor de 10 veces mayor que la unión de fondo, alrededor de 20 veces mayor que la unión de fondo, alrededor de 50 veces mayor que la unión de fondo, alrededor de 100 veces mayor que la unión de fondo o alrededor de 1000 veces mayor que la unión de fondo o más.

En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular de una CAR comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este. Un "anticuerpo" se refiere a un agente aglutinante que es un polipéptido que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce y se une específicamente a un epítipo de un antígeno, tal como un péptido, lípido, polisacárido o ácido nucleico que contiene un determinante antigénico, tal como los reconocidos por una célula inmunitaria.

Un "antígeno (Ag)" se refiere a un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, que incluye composiciones (tales como una que incluye una proteína específica del cáncer) que se inyectan o absorben en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, incluidos los inducidos por antígenos heterólogos, tales como los antígenos descritos. En algunas

modalidades, el antígeno diana es un epítopo de un polipéptido MUC16.

Un "epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a la región de un antígeno a la que se une un agente aglutinante. Los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegado terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a solventes desnaturalizantes mientras que los epítopos formados por plegado terciario se pierden típicamente en el tratamiento con solventes desnaturalizantes. Un epítopo incluye típicamente al menos 3, y más usualmente, al menos 5, aproximadamente 9, o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Los anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como Ig de camello, Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'₂, fragmentos F(ab)'₃, Fv, proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), bis-scFv, (scFv)₂, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, proteínas Fv estabilizadas por disulfuro ("dsFv"), y anticuerpo de dominio único (sdAb, Nanocuerpo) y porciones de anticuerpos de longitud completa responsables de la unión a antígeno. El término también incluye formas modificadas genéticamente tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Ver también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3a Ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "anticuerpo biespecífico" significa un anticuerpo que comprende al menos un primer dominio de unión a antígeno y un segundo dominio de unión a antígeno. Cada dominio de unión a antígeno dentro del anticuerpo biespecífico comprende al menos una CDR que se une específicamente a un antígeno particular, sola o en combinación con una o más CDR y/o FR adicionales.

Como entenderá el experto en la técnica y como se describe en otra parte de la presente descripción, un anticuerpo completo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada consiste en una región variable y una primera, segunda y tercera región constante, mientras que cada cadena ligera consiste en una región variable y una región constante. Las cadenas pesadas de mamíferos se clasifican como α , δ , ϵ , γ , y μ . Las cadenas ligeras de mamíferos se clasifican como λ o κ . Las inmunoglobulinas que comprenden las cadenas pesadas α , δ , ϵ , γ , y μ se clasifican como inmunoglobulina (Ig)A, IgD, IgE, IgG e IgM. El anticuerpo completo forma una forma "Y". El tallo de la Y consiste en la segunda y tercera regiones constantes (y para IgE e IgM, la cuarta región constante) de dos cadenas pesadas unidas entre sí y se forman enlaces disulfuro (entre cadenas) en la bisagra. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta por tres dominios Ig en serie (en línea), y una región bisagra para una mayor flexibilidad; las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta por cuatro dominios de inmunoglobulina. La segunda y tercera regiones constantes se denominan "dominio CH2" y "dominio CH3", respectivamente. Cada brazo de la Y incluye la región variable y la primera región constante de una única cadena pesada unida a las regiones variable y constante de una única cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son responsables de la unión al antígeno.

Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región "marco" (FR) interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las CDR pueden definirse o identificarse mediante métodos convencionales, tal como mediante una secuencia de acuerdo con Kabat y otros (Wu, TT y Kabat, E. A., *J Exp Med.* 132(2):211-50, (1970); Borden, P. y Kabat E. A., *PNAS*, 84: 2440-2443 (1987); (ver, Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, que se incorpora por la presente como referencia), o mediante una

estructura de acuerdo con Chothia y otros (Chothia, C. y Lesk, A.M., *J Mol. Biol.*, 196(4): 901-917 (1987), Chothia, C. y otros, *Nature*, 342: 877 - 883 (1989)).

Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie, tal como los seres humanos. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando a partir del extremo N, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se ubica la CDR particular. Por lo tanto, las CDR localizadas en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, mientras que las CDR localizadas en el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Los anticuerpos con diferentes especificidades (*es decir*, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de anticuerpo a anticuerpo, solo un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están directamente implicadas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos determinantes de especificidad (SDR). Los ejemplos ilustrativos de CDR de cadena ligera que son adecuados para construir los CAR anti-MUC16 contemplados en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de CDR expuestas en las SEQ ID NO: 1-3. Los ejemplos ilustrativos de CDR de cadena pesada que son adecuados para construir los CAR anti-MUC16 contemplados en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de CDR expuestas en las SEQ ID NO: 4-6.

Los ejemplos ilustrativos de reglas para predecir las CDR de cadena ligera incluyen: CDR-L1 comienza en alrededor del residuo 24, está precedida por una Cys, tiene alrededor de 10-17

residuos, y le sigue un Trp (típicamente Trp-Tyr-Gln, pero también, Trp-Leu-Gln, Trp- Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu); CDR-L2 comienza alrededor de 16 residuos después del final de CDR-L1, está generalmente precedida por Ile-Tyr, pero también, Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe, y tiene 7 residuos; y CDR-L3 comienza alrededor de 33 residuos después del final de CDR-L2, está precedida por una

5 Cys, tiene 7-11 residuos, y le sigue Phe-Gly-XXX-Gly (XXX es cualquier aminoácido).

Los ejemplos ilustrativos de reglas para predecir las CDR de cadena pesada incluyen: CDR-H1 comienza en alrededor del residuo 26, está precedida por Cys-XXX-XXX-XXX, tiene 10-12 residuos y le sigue un Trp (típicamente Trp-Val, pero también, Trp-Ile, Trp-Ala); CDR-H2 inicia alrededor de 15 residuos después del final de la CDR-H1, generalmente está precedida por Leu-

10 Glu-Trp-Ile-Gly, o una serie de variaciones, tiene 16-19 residuos, y le sigue Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala; y CDR-H3 comienza alrededor de 33 residuos después del final de CDR-H2, está precedida por Cys-XXX-XXX (típicamente Cys-Ala-Arg), tiene 3 a 25 residuos, y le sigue Trp-Gly-XXX-Gly.

En algunas modalidades, las CDR de cadena ligera y las CDR de cadena pesada se determinan

15 de acuerdo con el método Kabat. En algunas modalidades, las CDR de cadena ligera y las CDR2 y CDR3 de cadena pesada se determinan de acuerdo con el método Kabat, y la CDR1 de cadena pesada se determina de acuerdo con el método AbM, que es una comprende entre los métodos Kabat y Clothia, ver por ejemplo, Whitelegg N & Rees AR, Protein Eng. Dic 2000;13(12):819-24 y Methods Mol Biol. 2004;248:51-91. Los programas para predecir las CDR están disponibles

20 públicamente, por ejemplo, AbYsis (www.bioinf.org.uk/abysis/).

Las referencias a "VH" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab, u otro fragmento de anticuerpo como se describe en la presente descripción. Las referencias a "VL" o "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, que incluye la de un anticuerpo,

Fv, scFv, dsFv, Fab u otro fragmento de anticuerpo como se describe en la presente descripción.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de cadena ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, al producir células híbridas formadoras de anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células del bazo inmunitario. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Un "anticuerpo quimérico" tiene residuos marco de una especie, tal como un ser humano, y las CDR (que generalmente confieren unión a antígeno) de otra especie, tal como un ratón. En modalidades particularmente preferidas, un CAR contemplado en la presente descripción comprende un dominio de unión específico de antígeno que es un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión a antígeno de este.

Un anticuerpo "humanizado" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante", y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptor".

En modalidades particulares, un anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno del mismo, incluye pero no se limita a una Ig de camello (un anticuerpo de camélido (VHH)), Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2, fragmentos F(ab)'3, Fv, anticuerpo Fv de cadena simple ("scFv"), bis-scFv, (scFv)₂, minicuerpo, diabodia, triabodia, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada por disulfuro ("dsFv"), y anticuerpo de dominio único (sdAb, Nanobody).

"Ig de camello" o "VHH de camélido" como se usa en la presente descripción se refiere a la unidad de unión a antígeno conocida más pequeña de un anticuerpo de cadena pesada (Koch-Nolte, y otros, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Un "anticuerpo de cadena pesada" o un "anticuerpo de

camélido" se refiere a un anticuerpo que contiene dos dominios VH y no cadenas ligeras (Riechmann L. y otros, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); WO94/04678; WO94/25591; patente de Estados Unidos núm. 6,005,079).

- "IgNAR" de "nuevo receptor antigénico de inmunoglobulina" se refiere a la clase de anticuerpos del repertorio inmunitario de tiburón que consiste en homodímeros de un dominio variable de nuevo receptor antigénico (VNAR) y cinco dominios constantes de nuevo receptor antigénico (CNAR). Los IgNAR representan algunos de los andamios de proteínas a base de inmunoglobulinas más pequeños conocidos y son altamente estables y poseen características de unión eficientes. La estabilidad inherente puede atribuirse tanto a (i) el andamio de Ig subyacente, que presenta un número considerable de residuos cargados e hidrófilos expuestos a la superficie en comparación con los dominios VH y VL de anticuerpos convencionales que se encuentran en anticuerpos murinos; como a (ii) las características estructurales estabilizantes en los lazos de la región determinante de complementariedad (CDR) que incluyen puentes disulfuro entre lazos, y patrones de enlaces de hidrógeno intralazo.
- La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígenos y aún es capaz de reticular el antígeno.
- "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. En una modalidad, una especie de Fv bicatenaria consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación ajustada no covalente. En una especie de Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera puede unirse covalentemente por un enlazador peptídico flexible de manera que las cadenas ligera y

pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie (scFv)₂ de Fv bicatenaria. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis HVR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente descripción para Fab' en la que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes porta(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson y otros, Nat. Med. 9:129-134 (2003); y

Hollinger y otros, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson y otros, Nat. Med. 9:129-134 (2003).

"Anticuerpo de dominio único" o "sdAb" o "nanocuerpo" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en la región variable de una cadena pesada de anticuerpo (dominio VH) o la región variable de una cadena ligera de anticuerpo (dominio VL) (Holt, L., y otros, Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490).

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica y en cualquier orientación (por ejemplo, VL-VH o VH-VL). Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, ver, *por ejemplo*, Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno es un scFv. Los anticuerpos monocatenarios pueden clonarse a partir de los genes de la región V de un hibridoma específico para una diana deseada. La producción de tales hibridomas se ha vuelto rutinaria. Se ha descrito una técnica que puede usarse para clonar la cadena pesada de región variable (VH) y la cadena ligera de región variable (VL), por ejemplo, en Orlandi y otros, PNAS, 1989; 86: 3833-3837.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno es un scFv que se une a un polipéptido MUC16 humano. Un ejemplo ilustrativo de una cadena pesada variable que es adecuada para construir los CAR anti-MUC16 contemplados en la presente descripción es la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8. Un ejemplo ilustrativo de una cadena ligera variable que es adecuada para construir los CAR anti-MUC16 contemplados en la presente descripción es la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera

variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO: 72. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72. En algunas modalidades, el dominio de

5 unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94

10 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16

15 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la

20 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94

%, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos

que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 108. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107. En algunas modalidades, el

5 dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 107. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de

10 aminoácidos de SEQ ID NO: 108 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-

15 MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 120. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119. En algunas modalidades, el

20 dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 119. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 120 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 134. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 133. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 146. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la

5 SEQ ID NO: 145. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno específico de un CAR anti-MUC16 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145.

Los dominios específicos de MUC16 proporcionados en la presente descripción también
10 comprenden una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. Tales CDR pueden ser CDR no humanas o CDR no humanas alteradas seleccionadas de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de la cadena ligera y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 de la cadena pesada. En algunas modalidades, un dominio de unión específico de MUC16 comprende (a) una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 de cadena ligera, una CDRL2 de cadena ligera y una CDRL3 de cadena ligera, y (b) una
15 región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 de cadena pesada, una CDRH2 de cadena pesada y una CDRH3 de cadena pesada.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 1-3. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena pesada
20 de las SEQ ID NO: 4-6. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 1-3 y las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 4-6.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 41-43. En algunas modalidades, el

dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 44-46. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 41-43 y las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 44-46.

- 5 En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 53-55. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 56-58. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 53-10 55 y las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 56-58.

- En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 65-67. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 68-70. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 65-15 67 y las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 68-70.

- En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 77-79. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 80-82. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 77-20 79 y las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 80-82.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 89-91. En algunas modalidades, el

dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 92-94. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 89-91 y las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 92-94.

- 5 En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 101-103. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 104-106. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 101-103 y las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 104-106.

- 10 En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 113-115. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 116-118. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 113-115 y las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 116-118.

- 15 En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 127-129. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 130-132. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 127-129 y las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 130-132.

- 20 En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 139-141. En algunas modalidades, el

dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 142-144. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 comprende las CDR de cadena ligera de las SEQ ID NO: 139-141 y las CDR de cadena pesada de las SEQ ID NO: 142-144.

- 5 En la técnica se conocen anticuerpos anti-MUC16 adicionales, y fragmentos de unión al antígeno de estos. Véase, por ejemplo, el documento WO2018/058003, publicado el 29 de marzo de 2018, todos los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan expresamente en la presente descripción como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 se une al MUC16 humano dentro de uno o más cinco dominios SEA proximales a la membrana del MUC16 humano. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 se une a los dominios SEA 12-16, numerados de N-terminal a C-terminal, de MUC16 humano. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 se une a los dominios SEA de MUC16 humano como se establece en los residuos 13791-14451 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 se une dentro de los residuos 13810-14451 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 no se une a los dominios SEA 1-11, numerados de N-terminal a C-terminal, de MUC16 humano. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 no se une dentro de los residuos 1-13790 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 no se une dentro de los residuos 1-13809 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 se une dentro de la SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 se une dentro de la SEQ ID NO: 151. En

algunas modalidades, el dominio de unión específico de antígeno de un CAR anti-MUC16 no se une dentro de la SEQ ID NO: 40.

2. Enlazadores

En algunas modalidades, los CAR contemplados en la presente descripción pueden comprender
 5 residuos enlazadores entre los diversos dominios, *por ejemplo*, añadidos para la separación y conformación apropiadas de la molécula. En algunas modalidades, el enlazador es una secuencia de enlace de región variable. Una "secuencia de enlace de región variable", es una secuencia de aminoácidos que conecta los dominios V_H y V_L y proporciona una función de espaciador compatible con la interacción de los dos subdominios de unión de manera que el polipéptido
 10 resultante retiene una afinidad de unión específica a la misma molécula diana que un anticuerpo que comprende las mismas regiones variables de cadena ligera y pesada. En otras modalidades el enlazador es una secuencia de enlace entre el dominio transmembrana y uno o más dominios intracelulares.

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

20 Los ejemplos ilustrativos de enlazadores incluyen polímeros de glicina (G_n); polímeros de glicina-serina ($G_{1-5}S_{1-5}$) $_n$, donde n es un número entero de al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco; polímeros de glicina-alanina; polímeros de alanina-serina; y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina están relativamente no estructurados, y por lo tanto pueden servir como un cordón neutro entre dominios de proteínas de fusión tales

como los CAR descritos en la presente descripción. La glicina accede a significativamente más espacio de phi-psi que incluso alanina, y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (*ver Scheraga, Rev. Computational Chem . 11173-142 (1992)*). El experto en la técnica reconocerá que el diseño de un CAR puede incluir enlazadores que son

5 total o parcialmente flexibles, de manera que el enlazador puede incluir un enlazador flexible así como también una o más porciones que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura CAR deseada.

Otros enlazadores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a las siguientes secuencias de aminoácidos: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 14); TGEKP (SEQ ID NO: 15) (*ver, por ejemplo, Liu y*

10 *otros, PNAS 5525-5530 (1997)*); GGRR (SEQ ID NO: 16) (*Pomerantz y otros 1995, supra*); (GGGGS)_n en donde = 1, 2, 3, 4 ó 5 (SEQ ID NO: 17) (*Kim y otros, PNAS 93, 1156-1160 (1996.)*); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 18) (*Chaudhary y otros, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070*); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 19) (*Bird y otros, 1988, Science 242:423-426*), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 20); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 21);

15 LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO: 22); LRQKd(GGGS)₂ ERP (SEQ ID NO: 23). En algunas modalidades, el enlazador es GGGGSGGGGGSGGGS (SEQ ID NO: 24). Alternativamente, los enlazadores flexibles pueden diseñarse racionalmente utilizando un programa informático capaz de modelar tanto los sitios de unión al ADN como los propios péptidos (*Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993)*, *PNAS 91:11099-11103 (1994)* o mediante métodos de visualización de

20 fagos. En algunas modalidades, el enlazador comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 25) (*Cooper y otros, Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)*). En una modalidad, el enlazador comprende una secuencia de LYC.

3. Dominio espaciador

En algunas modalidades, el dominio de unión del CAR es seguido por uno o más "dominios

espaciadores", que se refiere a la región que aleja el dominio de unión a antígeno de la superficie celular efectora para permitir un contacto célula/célula adecuado, unión a antígeno y activación (Patel y otros, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). El dominio espaciador puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. En ciertas modalidades, un dominio espaciador es una porción de una inmunoglobulina, que incluye, pero no se limita a, una o más regiones constantes de la cadena pesada, *por ejemplo*, CH2 y CH3. El dominio espaciador puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

En alguna modalidad, el dominio espaciador comprende los dominios CH2 y CH3 de IgG1 o IgG4.

10 **4. Dominio de bisagra**

En algunas modalidades, el dominio de unión del CAR va seguido de uno o más "dominios bisagra" o "regiones bisagra", que desempeñan un papel en el posicionamiento del dominio de unión al antígeno lejos de la superficie de la célula efectora para permitir un contacto célula/célula adecuado, la unión al antígeno y la activación. En algunas modalidades, un CAR generalmente comprende uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio transmembrana (TM). El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

Una "región bisagra alterada" se refiere a (a) una región bisagra de origen natural con hasta un 30 % de cambios de aminoácidos (por ejemplo, hasta el 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos), (b) una porción de una región bisagra de origen natural que tiene al menos 10 aminoácidos (por ejemplo, al menos 12, 13, 14 o 15 aminoácidos) de longitud con hasta un 30 % de cambios de aminoácidos (por ejemplo, hasta el 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos), o (c) una porción de una región

bisagra de origen natural que comprende la región bisagra del núcleo (que puede tener 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 aminoácidos de longitud). En algunas modalidades, uno o más residuos de cisteína en una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural pueden sustituirse por uno o más residuos de otros aminoácidos (*por ejemplo*, uno o más residuos de serina). Una región bisagra de inmunoglobulina alterada puede tener alternativa o adicionalmente un residuo de prolina de una región bisagra de inmunoglobulina de tipo salvaje sustituida por otro residuo de aminoácido (*por ejemplo*, un residuo de serina).

Otros dominios bisagra ilustrativos adecuados para su uso en los CAR descritos en la presente descripción incluyen la región bisagra derivada de las regiones extracelulares de proteínas de membrana tipo 1 tales como CD8 α , CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones bisagra de tipo silvestre de estas moléculas o pueden alterarse. En una modalidad, el dominio bisagra comprende una región bisagra CD28. En otra modalidad, el dominio bisagra comprende una región bisagra CD4. En otra modalidad, el dominio bisagra comprende una región bisagra CD8 α .

En varias modalidades, la región de bisagra modificada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con un dominio/región de bisagra adecuado como se contempla en la presente descripción y/o se conoce en la técnica. En algunas modalidades, la región de bisagra modificada que comprende una secuencia de bisagra como se contempla en la presente descripción que tiene 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos sustituciones y/o deleciones de aminoácidos.

En determinadas modalidades, uno o más residuos de cisteína en una región/dominio bisagra de origen natural pueden sustituirse por uno o más residuos de aminoácidos diferentes para producir un dominio bisagra modificado. En algunas modalidades, el dominio bisagra modificado

comprende uno o más residuos de cisteína sustituidos con serina(s) o alanina(s). En otra modalidad, el dominio bisagra modificado comprende uno o más residuos de cisteína sustituidos con serina(s). En otra modalidad, el dominio bisagra modificado comprende uno o más residuos de cisteína sustituidos con alanina(s).

- 5 En modalidades particulares, una región de bisagra alterada comprende la sustitución de un residuo de prolina por otro residuo de aminoácido (*por ejemplo*, un residuo de serina).

En algunos aspectos, la región de bisagra comprende una secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 153. En una modalidad, el polipéptido de región de bisagra
10 comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 153. En una modalidad, el polipéptido de la región de bisagra comprende la SEQ ID NO: 153.

5. Dominio transmembrana (TM)

En algunas modalidades, un CAR contemplado en la presente descripción comprende un dominio transmembrana. El “dominio transmembrana” o “dominio TM” es la porción del CAR que fusiona
15 la porción de unión extracelular y el dominio de señalización intracelular y ancla el CAR a la membrana plasmática de la célula efectora inmunitaria. El dominio TM puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio TM puede derivarse de (es decir, comprender al menos la(s) región(es) transmembrana(s) de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27,
20 CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD 154 y PD1. En una modalidad particular, el dominio TM es sintético y predominantemente comprende residuos hidrofóbicos tales como leucina y valina.

En algunos aspectos, los CAR contemplados en la presente descripción comprenden un dominio TM derivado de CD8α. En algunas modalidades, el dominio transmembrana comprende una

secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 154. En una modalidad, el dominio transmembrana comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 154. En una modalidad, el dominio transmembrana comprende la SEQ ID NO: 154.

- 5 En algunas modalidades, un CAR contemplado en la presente descripción comprende un dominio TM derivado de CD8 α y un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud que unen el dominio TM y el dominio de señalización intracelular del CAR. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador a base de glicina-serina. En otras modalidades, el enlazador es un enlazador LYC.
- 10 En otro aspecto, los CAR contemplados en la presente descripción comprenden un dominio TM derivado de CD28. En otro aspecto, los CAR contemplados en la presente descripción comprenden un dominio TM derivado de CD4.

6. Dominio de señalización intracelular

- En algunas modalidades, los CAR contemplados en la presente descripción comprenden un
- 15 dominio de señalización intracelular. Un "dominio de señalización intracelular", se refiere a la parte de un CAR que participa en la transducción del mensaje de unión efectiva de MUC16 CAR a un polipéptido MUC16 humano en el interior de la célula efectora inmunitaria para inducir la función de la célula efectora, por ejemplo, activación, producción de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, incluida la liberación de factores citotóxicos a la célula diana unida al CAR, u
 - 20 otras respuestas celulares provocadas por la unión del antígeno al dominio CAR extracelular.

El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula efectora inmunitaria. La función efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o la ayuda o la actividad, incluida la secreción de una citocina. Por lo tanto, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de función

efectora y que dirige a la célula a realizar una función especializada. Aunque usualmente puede emplearse todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar todo el dominio. En la medida en que se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular, tal porción truncada puede usarse en lugar de todo el dominio siempre que transduzca la señal de función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora.

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

Los dominios de señalización primaria regulan la activación primaria del complejo de TCR ya sea de manera estimuladora o de manera inhibidora. Los dominios de señalización primaria que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores o ITAM.

Ejemplos ilustrativos de ITAM que contienen dominios de señalización primarios que son de uso particular en la invención incluyen los derivados de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, y CD66d. En algunas modalidades, un CAR comprende un dominio de

señalización primario CD3 ζ y uno o más dominios de señalización coestimuladores. Los dominios intracelulares de señalización primaria y de señalización coestimuladora pueden unirse en cualquier orden en serie al extremo carboxilo del dominio transmembrana.

Los CAR contemplados en el presente documento comprenden uno o más dominios de señalización coestimuladora para mejorar la eficacia y la expansión de las células T que expresan receptores CAR. Como se usa en la presente, el término "dominio de señalización coestimulador" o "dominio coestimulador" se refiere a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de superficie celular que no son receptores de antígeno o receptores de Fc que proporcionan una segunda señal requerida para una activación y función eficientes de los linfocitos T tras la unión al antígeno. Los ejemplos ilustrativos de tales moléculas coestimuladoras incluyen CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, y ZAP70. En algunas modalidades, un CAR comprende uno o más dominios de señalización coestimuladora seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137 y CD134, y un dominio de señalización primaria de CD3 ζ .

En algunas modalidades, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladora CD28 y CD137 y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

En algunas modalidades, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladora CD28 y CD134 y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

En algunas modalidades, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladora CD137 y CD134 y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

En algunas modalidades, un CAR comprende un dominio de señalización coestimuladora de CD134 y un dominio de señalización primario de CD3 ζ .

En algunas modalidades, un CAR comprende un dominio de señalización coestimuladora de CD28 y un dominio de señalización primario de CD3ζ.

En algunas modalidades, un CAR comprende un dominio de señalización coestimuladora de CD137 y un dominio de señalización primario de CD3ζ.

- 5 En algunos aspectos, el uno o más dominios de señalización coestimuladores son de CD137 (4-1BB). En algunos aspectos, el dominio de señalización coestimuladora comprende una secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con, o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 155. En una modalidad, el dominio de señalización coestimuladora comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad
- 10 con la SEQ ID NO: 155. En una modalidad, el dominio de señalización coestimuladora comprende la SEQ ID NO: 155.

- En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el dominio de señalización principal es de CD3ζ. En algunos aspectos, el dominio de señalización principal comprende una secuencia que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad
- 15 con, o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 156. En una modalidad, el dominio de señalización principal comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 156. En una modalidad, el dominio de señalización principal comprende la SEQ ID NO: 156.

D. Receptores de antígeno quiméricos ilustrativos

- 20 En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que se une a un polipéptido MUC16; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154, y PD1; y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular de una

molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, y ZAP70; un dominio de señalización primario de

5 TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, y CD66d.

En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que se une a un polipéptido MUC16; un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: bisagra de IgG1/CH2/CH3, bisagra de IgG4/CH2/CH3 y una bisagra de CD8 α ; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa, beta o zeta del receptor de

10 células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154, y PD1; y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM),

15 CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, y ZAP70; un dominio de señalización primario de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, y CD66d.

En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que se une a un polipéptido MUC16; un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: Bisagra de IgG1/CH2/CH3, Bisagra de IgG4/CH2/CH3, y una bisagra de CD8 α ; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: alfa, cadena beta o zeta del receptor de

20 células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154, y PD1; un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos de longitud que unen el

dominio TM al dominio de señalización intracelular del CAR; y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM),
 5 CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, y ZAP70; un dominio de señalización primario de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, y CD66d.

En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que se une a un polipéptido MUC16; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana de
 10 CD8 α que comprende opcionalmente un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos; un dominio de señalización coestimuladora intracelular de CD137; y un dominio de señalización primario de CD3 ζ .

En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que se une dentro de la SEQ ID NO: 39 o 151; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo
 15 que consiste en: cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1; y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150
 20 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, y ZAP70; un dominio de señalización primario de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, y CD66d.

En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que se une dentro de la SEQ ID NO: 39 o 151; un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: bisagra de

IgG1/CH2/CH3, bisagra de IgG4/CH2/CH3 y una bisagra de CD8 α ; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154, y PD1; y uno o más dominios

5 de señalización coestimuladora intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, y ZAP70; un dominio de señalización primario de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ ,

10 CD22, CD79a, CD79b, y CD66d.

En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que se une dentro de la SEQ ID NO: 39 o 151; un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: Bisagra de IgG1/CH2/CH3, Bisagra de IgG4/CH2/CH3, y una bisagra de CD8 α ; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: alfa, cadena beta o zeta del

15 receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, EC 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154, y PD1; opcionalmente un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos de longitud que unen el dominio TM al dominio de señalización intracelular del CAR; y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular de una molécula

20 coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, y ZAP70; un dominio de señalización primario de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b, y CD66d.

En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que se une dentro de la SEQ ID NO: 39 o la SEQ ID NO: 151; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α , que comprende opcionalmente un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos, tal como LYC; un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD137; y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que comprende CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 1-3 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 4-6; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana de CD8 α que comprende opcionalmente un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos; un dominio de señalización coestimuladora intracelular de CD137; y un dominio de señalización principal de CD3 ζ .

En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que comprende (a) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 41-43 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 44-46; (b) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 53-55 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 56-58; (c) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 65-67 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 68-70; (d) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 77-79 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 80-82; (e) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 89-91 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 92-94; (f) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 101-103 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 104-106; (g) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 113-115 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 116-118; (h) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 127-129 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 130-132; o (i)

CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 139-141 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 142-144; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α que comprende opcionalmente un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos, como LYC; un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD137; y un dominio de señalización primario de CD3 ζ .

En algunas modalidades, un polipéptido señal de CD8 α , un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que comprende CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 1-3 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 4-6; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana de CD8 α que comprende opcionalmente un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos, tal como LYC; un dominio de señalización coestimuladora intracelular de CD137; y un dominio de señalización primario de CD3 ζ .

En algunas modalidades, un polipéptido señal CD8 α , un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que comprende (a) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 41-43 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 44-46; (b) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 53-55 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 56-58; (c) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 65-67 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 68-70; (d) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 77-79 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 80-82; (e) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 89-91 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 92-94; (f) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 101-103 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 104-106; (g) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 113-115 y CDR

de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 116-118; (h) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 127-129 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 130-132; o (i) CDR de cadena ligera como se establece en las SEQ ID NO: 139-141 y CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 142-144; y un dominio bisagra que

5 comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α que comprende opcionalmente un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos, como LYC; un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD137; y un dominio de señalización primario de CD3 ζ .

En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que comprende una cadena

10 ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 8; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α que comprende opcionalmente un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos, tal como LYC; un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD137; y un dominio de señalización principal de CD3 ζ .

15 En algunas modalidades, un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que comprende (a) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 47 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 48; (b) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 59 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 60; (c) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 71 y una cadena pesada variable

20 como se establece en la SEQ ID NO: 72; (d) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 83 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 84; (e) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 95 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 96; (f) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 107 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 108; (g)

- una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 119 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 120; (h) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 133 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 134; o (i) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 145 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 146; y un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α que comprende opcionalmente un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos, como LYC; un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD137; y un dominio de señalización primario de CD3 ζ .
- 10 En algunas modalidades, un polipéptido señal de CD8 α , un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que comprende una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 8; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana de CD8 α que comprende opcionalmente un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos, tal como
- 15 LYC; un dominio de señalización coestimuladora intracelular de CD137; y un dominio de señalización primaria de CD3 ζ .
- En algunas modalidades, un polipéptido señal CD8 α , un CAR comprende un scFv anti-MUC16 que comprende (a) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 47 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 48; (b) una cadena ligera variable
- 20 como se establece en la SEQ ID NO: 59 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 60; (c) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 71 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 72; (d) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 83 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 84; (e) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 95 y una

cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 96; (f) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 107 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 108; (g) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 119 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 120; (h) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 133 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 134; o (i) una cadena ligera variable como se establece en la SEQ ID NO: 145 y una cadena pesada variable como se establece en la SEQ ID NO: 146; y un dominio transmembrana CD8 α que comprende opcionalmente un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos, como LYC; un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD137; y un dominio de señalización primario de CD3 ζ .

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 9.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 49. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 49. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 49. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 49.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 51. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 51. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 51. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 51.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 61. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 61. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 61. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 61.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 63. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 63. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 63. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 63.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 73. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 73. En algunas modalidades, un CAR

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 73. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 73.

- 5 En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 75. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 75. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 75. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene
- 10 al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 75.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 85. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 85. En algunas modalidades, un CAR

15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 85. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 85.

- En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la
- 20 SEQ ID NO: 87. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 87. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 87. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93

%, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 87.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 97. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 97. En algunas modalidades, un CAR

5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 97. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 97.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la

10 SEQ ID NO: 99. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 99. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 99. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93
15 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 99.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 109. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 109. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID

20 NO: 109. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 109.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 111. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos

que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 111. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 111. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 111.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 121. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 121. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 121. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 121.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 123. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 123. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 123. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 123.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 125. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 125. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 125. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 125.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 135. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos

5 que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 135. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 135. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 135.

10 En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 137. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 137. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 137. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

15 al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 137.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 147. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 147. En algunas modalidades, un CAR

20 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 147. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 147.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la

SEQ ID NO: 149. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 149. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 149. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 149.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 11. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 11. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 11. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 50. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 50. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 50. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 50.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 52. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 52. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID

NO: 52. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 52.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la

5 SEQ ID NO: 62. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 62. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 62. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93
10 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 62.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la

SEQ ID NO: 64. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 64. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID
15 NO: 64. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 64.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la

SEQ ID NO: 74. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos
20 que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 74. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 74. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 74.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 76. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 76. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 76. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 76.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 86. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 86. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 86. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 86.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 88. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 88. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 88. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 88.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 98. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 98. En algunas modalidades, un CAR

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 98. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 98.

- 5 En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 100. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 100. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 100. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene
- 10 al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 100.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 110. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 110. En algunas modalidades, un CAR

15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 110. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 110.

- En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la
- 20 SEQ ID NO: 112. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 112. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 112. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93

%, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 112.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 122. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 122. En algunas modalidades, un CAR

5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 122. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 122.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la

10 SEQ ID NO: 124. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 124. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 124. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93
15 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 124.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 126. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 126. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID

20 NO: 126. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 126.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 136. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos

que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 136. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 136. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 136.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 138. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 138. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 138. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 138.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 148. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 148. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 148. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 148.

En algunas modalidades, un CAR comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 150. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 150. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 150. En algunas modalidades, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 150.

Además, el diseño de los CAR contemplados en la presente descripción permite una expansión mejorada, persistencia a largo plazo y propiedades citotóxicas tolerables en células T que expresan los CAR en comparación con células T no modificadas o células T modificadas para expresar otros CAR.

E. Polipéptidos

La presente descripción contempla, en parte, polipéptidos CAR y fragmentos de estos, células y composiciones que comprenden los mismos, y vectores que expresan polipéptidos. En algunas modalidades, se proporciona un polipéptido que comprende uno o más CAR como se establece en la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, se proporciona un polipéptido que comprende uno o más CAR como se establece en la SEQ ID NO: 11.

"Polipéptido", "fragmento de polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente, a menos que se especifique lo contrario, y según el significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica, por ejemplo, pueden comprender una secuencia de proteína de longitud completa, un fragmento de una proteína de longitud completa y pueden incluir modificaciones postraduccionales del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como también otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural. En varias modalidades, los polipéptidos CAR contemplados en la presente descripción comprenden una secuencia de polipéptidos señal (o líder) en el N-terminal de la proteína, que dirige cotraduccional o posttraduccionalmente la transferencia de la proteína. Los ejemplos ilustrativos de secuencias polipeptídicas señal adecuadas útiles en los CAR descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, una secuencia polipeptídica señal de la cadena pesada de IgG1, una

secuencia polipeptídica señal del receptor del factor estimulante de la colonia 2 de granulocitos-macrófagos (GM-CSFR2), una secuencia polipeptídica señal Igk o una secuencia polipeptídica señal de CD8 α . Los polipéptidos pueden prepararse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas recombinantes y/o sintéticas bien conocidas. Los polipéptidos contemplados en la presente descripción abarcan específicamente los CAR de la presente descripción, o secuencias que tienen deleciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un CAR como se describe en la presente descripción.

Un "péptido aislado" o un "polipéptido aislado" y similares, como se usa en la presente descripción, se refieren al aislamiento y/o purificación *in vitro* de una molécula peptídica o polipeptídica de un entorno celular, y de la asociación con otros componentes de la célula, es decir, no se asocia significativamente con sustancias *in vivo*. De manera similar, una "célula aislada" se refiere a una célula que se ha obtenido de un tejido u órgano *in vivo* y está sustancialmente libre de matriz extracelular.

Los polipéptidos incluyen "variantes polipeptídicas". Las variantes polipeptídicas pueden diferir de un polipéptido de origen natural en una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones. Tales variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores. Por ejemplo, en modalidades particulares, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de los CAR introduciendo una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones en un dominio de unión, bisagra, dominio TM, codominio de señalización estimulante o dominio de señalización primario de un polipéptido CAR. Preferentemente, los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con ellos.

Los polipéptidos incluyen "fragmentos polipeptídicos". Los fragmentos polipeptídicos se refieren

a un polipéptido, que puede ser monomérico o multimérico, que tiene una deleción amino terminal, una deleción carboxilo terminal y/o una deleción interna o sustitución de un polipéptido de origen natural o producido de manera recombinante. En ciertas modalidades, un fragmento polipeptídico puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a alrededor de 500 aminoácidos de largo. Se apreciará que en ciertas modalidades, los fragmentos son al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, o 450 o más aminoácidos de largo. Los fragmentos polipeptídicos particularmente útiles incluyen dominios funcionales, que incluyen dominios de unión a antígeno o fragmentos de anticuerpos. En el caso de un anticuerpo anti-BCMA murino, los fragmentos útiles incluyen, pero no se limitan a: una región CDR, una región CDR3 de la cadena pesada o ligera; una región variable de una cadena pesada o ligera; una porción de una cadena de anticuerpo o región variable que incluye dos CDR; y similares.

El polipéptido también puede fusionarse en el marco o conjugarse con un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (*por ejemplo*, poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

Como se indicó anteriormente, los polipéptidos de la invención pueden alterarse de varias maneras que incluyen sustituciones, eliminaciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones se conocen generalmente en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido de referencia pueden prepararse mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones de las secuencias de nucleótidos se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Ciencias USA. 82: 488-492), Kunkel y otros, (1987, Methods in Enzymol, 154: 367-382), patente de Estados Unidos núm. 4,873,192, Watson, J. D. y otros, (Molecular Biology of the

Gene, Cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias citadas en el mismo. La orientación sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés puede encontrarse en el modelo de Dayhoff y otros, (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

- 5 En algunas modalidades, una variante contendrá sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es una en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no cambiasen sustancialmente. Pueden realizarse modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y
- 10 polipéptidos contemplados en la presente invención y aún obtener una molécula funcional que codifica una variante o polipéptido derivado con características convenientes. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear una variante polipeptídica de la invención equivalente, o incluso una mejorada, un experto en la técnica, por ejemplo, puede cambiar uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante, por ejemplo, de acuerdo
- 15 con la Tabla 1.

TABLA 1 - Codón de aminoácidos

Aminoácidos	Código de una letra	Código de tres letras	Codones			
Alanina	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU
Cisteína	C	Cys	UGC	UGU		
Ácido aspártico	D	Asp	GAC	GAU		

Ácido glutámico	E	Glu	GAA	GAG				
Fenilalanina	F	Phe	UUC	UUU				
Glicina	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	H	His	CAC	CAU				
Isoleucina	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
Lisina	K	Lis	AAA	AAG				
Leucina	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionina	M	Met	AUG					
Asparagina	N	Asn	AAC	AAU				
Prolina	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamina	Q	Gln	CAA	CAG				
Arginina	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptófano	W	Trp	UGG					
Tirosina	Y	Tyr	UAC	UAU				

La orientación para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin suprimir la actividad biológica puede encontrarse mediante el uso de programas informáticos bien conocidos en la técnica, tales como software DNASTAR™. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas descritas en la presente descripción son cambios de aminoácidos conservadores, es *decir*, sustituciones de aminoácidos cargados de manera similar o sin carga. Un cambio conservador de aminoácidos implica la sustitución de uno

de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En un péptido o proteína, los expertos en esta técnica conocen las substituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos y generalmente pueden producirse sin alterar una actividad biológica de una molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (ver, por ejemplo, Watson y otros *Molecular Biology of the Gene*, 4a edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224). Las sustituciones conservadoras ilustrativas se describen en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 61/241,647, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia.

Al realizar tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de aminoácidos. La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos para conferir una función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982, incorporado en la presente descripción como referencia). A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte y Doolittle, 1982).

Estos valores son: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cisteína (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serina (-0.8); triptófano (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); e ginarina (-4.5).

Se conoce en la técnica que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que

tienen un índice o puntuación hidropática similar y aún resultan en una proteína con actividad biológica similar, es *decir*, aún obtienen una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al realizar tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente los que están dentro de ± 1 y los que están dentro de ± 0.5 son aún más particularmente preferidos. También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede producirse efectivamente sobre la base de la hidrofilia.

Como se detalla en la patente de Estados Unidos núm. 4,554,101, los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a residuos de aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0 $\pm$ 1); glutamato (+3.0 $\pm$ 1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (−0.4); prolina (−0.5 $\pm$ 1); alanina (−0.5); histidina (−0.5); cisteína (−1.0); metionina (−1.3); valina (−1.5); leucina (−1.8); isoleucina (−1.8); tirosina (−2.3); fenilalanina (−2.5); triptofan (−3.4).

Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofilia similar y aún así obtener un equivalente biológico, y en particular, una proteína inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente los que están dentro de ± 1 y los que están dentro de ± 0.5 son aún más particularmente preferidos.

Como se describió anteriormente, las sustituciones de aminoácidos pueden basarse en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares.

Las variantes polipeptídicas incluyen además formas glicosiladas, conjugados agregados con otras moléculas, y conjugados covalentes con restos químicos no relacionados (*por ejemplo*, moléculas pegiladas). Las variantes covalentes pueden prepararse mediante la unión de funcionalidades a grupos que se encuentran en la cadena de aminoácidos o en el residuo N- o C-terminal, como se conoce en la técnica. Las variantes también incluyen variantes alélicas,

variantes de especies y mutéínas. Las truncaciones o deleciones de regiones que no afectan la actividad funcional de las proteínas también son variantes.

En algunas modalidades, donde se desea la expresión de dos o más polipéptidos, las secuencias polinucleotídicas que las codifican pueden separarse por una secuencia de IRES como se describe en otra parte de la presente descripción. En otra modalidad, dos o más polipéptidos pueden expresarse como una proteína de fusión que comprende una o más secuencias de polipéptidos de autoescisión.

Los polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos de fusión. En algunas modalidades, se proporcionan polipéptidos de fusión y polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión, por ejemplo, CARs. Los polipéptidos de fusión y las proteínas de fusión se refieren a un polipéptido que tiene al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez o más segmentos polipeptídicos. Los polipéptidos de fusión se unen típicamente del extremo C al extremo N, aunque también pueden unirse al extremo C, del extremo N al extremo N o del extremo N al extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden o en un orden especificado. Los polipéptidos de fusión o proteínas de fusión pueden incluir, además, variantes, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias y homólogos de interespecies modificados conservadoramente, siempre que se conserve la actividad transcripcional deseada del polipéptido de fusión. Los polipéptidos de fusión pueden producirse mediante métodos químicos sintéticos o mediante enlace químico entre las dos fracciones o pueden prepararse generalmente mediante el uso de otras técnicas estándar. Las secuencias de ADN ligadas que comprenden el polipéptido de fusión se unen operativamente a elementos de control transcripcional o traduccional adecuados como se analiza en otra parte de la presente descripción.

En una modalidad, un polipéptido de fusión comprende una secuencia que ayuda a expresar la

proteína (un potenciador de la expresión) a rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Pueden seleccionarse otras parejas de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína se dirija a los compartimentos intracelulares deseados o para facilitar el transporte de la proteína de fusión a través de la membrana celular.

- 5 Los polipéptidos de fusión pueden comprender además una señal de escisión polipeptídica entre cada uno de los dominios polipeptídicos descritos en la presente descripción. Además, el sitio polipeptídico puede colocarse en cualquier secuencia del péptido enlazador. Las señales de escisión polipeptídica ilustrativas incluyen sitios de reconocimiento de escisión polipeptídica tales como sitios de escisión por proteasas, sitios de escisión por nucleasas (por ejemplo, sitios de
- 10 reconocimiento de enzimas de restricción raras, sitios de reconocimiento de ribozimas de autoescisión) y oligopéptidos virales de autoescisión (ver deFelipe y Ryan, 2004. Traffic, 5(8); 616-26).

El experto en la técnica conoce los sitios de escisión por proteasas y los péptidos de autoescisión adecuados (ver, por ejemplo, en Ryan y otros, 1997. J. Gener. Virol. 78, 699-722; Scymczak y

- 15 otros (2004) Nature Biotech. 5, 589-594). Los sitios de escisión por proteasas ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, los sitios de escisión de las Nla proteasas de potyvirus (*por ejemplo*, proteasa del virus del grabado del tabaco), HC proteasas de potyvirus, P1 (P35) proteasas de potyvirus, Nla proteasas de byovirus, proteasas codificadas por RNA-2 de byovirus, L proteasas de aftovirus, 2A proteasas de enterovirus, 2A proteasas de comovirus, 3C proteasas de picoma, 24K
- 20 proteasas, 24K proteasas de nepovirus, similar a 3C proteasa de RTSV (vírico esférico tungro de arroz), similar a 3C proteasa de PYVF (virus de la coca amarilla) proteasa, heparina, trombina, factor Xa y enteroquinasa. Debido a su alta rigurosidad de escisión, los sitios de escisión de la proteasa de TEV (virus del grabado del tabaco) se prefieren en una modalidad, *por ejemplo*, EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 36), por ejemplo, ENLYFQG (SEQ ID NO: 37) y ENLYFQS (SEQ ID

NO: 38), en donde X representa cualquier aminoácido (se produce escisión por TEV entre Q y G o Q y S).

En modalidades particulares, la señal de escisión polipeptídica es un péptido de autoescisión viral.

- 5 En algunas modalidades, los péptidos autoescindibles incluyen aquellas secuencias polipeptídicas obtenidas de los péptidos aftovirus, potyvirus y cardiovirus 2A, FMDV (virus de la enfermedad del pie y la boca), virus de la rinitis equina A, virus Thosea asigna y teschovirus porcino.

En algunas modalidades, el sitio polipeptídico de autoescisión comprende un sitio, secuencia o
10 dominio similar a 2A o 2A (Donnelly y otros, 2001. J. Gen. Virol. 82:1027-1041). En la Tabla 2 se proporcionan ejemplos ilustrativos de sitios 2A.

TABLA 2

SEQ ID NO: 26	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 27	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 28	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 29	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 30	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 31	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 32	VTELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID NO: 33	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 34	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 35	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

En modalidades preferidas, un polipéptido contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido CAR.

F. Polinucleótidos

En algunas modalidades, se proporciona un polinucleótido que codifica uno o más polipéptidos CAR, *por ejemplo*, las SEQ ID NO: 10 y 12. En la presente descripción, los términos “polinucleótido” o “ácido nucleico” se refieren a ARN pre-mensajero (ARNpre-m), ARN mensajero (ARNm), ARN, 5 ARN genómico (ARNg), ARN de cadena positiva (ARN(+)), ARN de cadena negativa (ARN(-)), ADN genómico (ADNg), ADN amplificado por PCR, ADN complementario (ADNc), ADN sintético o ADN recombinante. Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios. Los polinucleótidos se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 1000, al menos 10,000, 10 o al menos 15,000 o más nucleótidos de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, así como también todas las longitudes intermedias. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tales como 6, 7, 8, 9, etc., 101, 15 102, 103, etc.; 151, 152, 153, etc.; 201, 202, 203, etc. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención incluyen polinucleótidos o variantes que tienen al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en la presente descripción (*ver, por ejemplo*, Listado de secuencias), típicamente cuando la variante mantiene 20 al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia. En varias modalidades ilustrativas, la presente descripción contempla, en parte, polinucleótidos que comprenden vectores de expresión, vectores virales y plásmidos de transferencia, y composiciones, y células que comprenden estos.

En algunas modalidades, los polinucleótidos se proporcionan mediante esta descripción que

codifican al menos aproximadamente 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 o 2000 o más residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido de la invención, así como también todas las longitudes intermedias. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tales como 6, 7, 8, 9, etc., 101, 102, 103, etc.; 151, 152, 153, etc.; 201, 202, 203, etc.

Como se usa en la presente, los términos "variante polinucleotídica" y "variante" y similares se refieren a polinucleótidos que muestran una identidad de secuencia sustancial con una secuencia polinucleotídica de referencia que se hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen a continuación. Estos términos incluyen polinucleótidos en los que se

han añadido o eliminado uno o más nucleótidos, o se han sustituido por nucleótidos diferentes en comparación con un polinucleótido de referencia. Con respecto a esto, se entiende bien en la técnica que ciertas alteraciones o modificaciones que incluyen mutaciones, adiciones, eliminaciones y sustituciones pueden realizarse a un polinucleótido de referencia de manera que el polinucleótido alterado o modificado retiene la función o actividad biológica del polinucleótido

de referencia. El término "fragmento de polinucleótido" puede referirse a un polinucleótido al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 o más nucleótidos de longitud

que codifica una variante polipeptídica que retiene al menos 100 %, al menos el 90 %, al menos 80 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, al menos 50 %, al menos el 40 %, al menos 30 %, al menos el 20 %, al menos 10 %, o al menos el 5 % de la actividad polipeptídica de origen natural.

Las citas "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia 50 % idéntica a", como se usa en la presente descripción, se refieren a la medida en que las secuencias son

idénticas en una base de nucleótido por nucleótido o una base de aminoácido por aminoácido sobre una ventana de comparación. Por lo tanto, un "porcentaje de identidad de secuencia" puede calcularse comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntico (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) se produce en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos que tienen al menos alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 86 %, 97 %, 98 % o 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en la presente descripción, típicamente donde la variante polipeptídica mantiene al menos una actividad biológica del polipéptido de referencia.

Los términos usados para describir las relaciones de secuencias entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es de al menos 12 pero con frecuencia de 15 a 18 y frecuentemente al menos 25 unidades de monómero, que incluyen nucleótidos y residuos de aminoácidos, de longitud. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de

secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, generalmente alrededor de 50 a alrededor de 100, más usualmente alrededor de 100 a alrededor de 150 en el que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean óptimamente. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, interrupciones) de alrededor de 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones informatizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en la versión 7.0 del paquete de software Genetics de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, Estados Unidos) o mediante inspección y la mejor alineación (es decir, lo que da como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia de programas BLAST como se describe por ejemplo en Altschul y otros, 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389. Una discusión detallada del análisis de secuencias puede encontrarse en la Unidad 19.3 de Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

En algunas modalidades, un CAR anti-MUC16 está codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, un CAR anti-MUC16 está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, un CAR anti-MUC16 está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 10.

92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, un CAR anti-MUC16 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90 % de identidad con SEQ ID NO: 10.

- 5 En algunas modalidades, un CAR anti-MUC16 está codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, un CAR anti-MUC16 está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, un CAR anti-MUC16 está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, un CAR anti-MUC16 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90 % de identidad con SEQ ID NO: 12.
- 10

- En algunas modalidades, se describe en la presente descripción una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR anti-MUC16 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 73, 74, 75, 76, 85, 86, 87, 88, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 135, 136, 137, 138, 147, 148, 149 o 150. En algunas modalidades, se describe en la presente descripción una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR anti-MUC16 que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 73, 74, 75, 76, 85, 86, 87, 88, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 135, 136, 137, 138, 147, 148, 149 o 150.
- 15
- 20

Como se usa en la presente, "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido que se ha purificado de las secuencias que lo flanquean en un estado de origen natural, por ejemplo, un

fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que son normalmente adyacentes al fragmento. Un "polinucleótido aislado" se refiere además a un ADN complementario (ADNc), un ADN recombinante, u otro polinucleótido que no existe en la naturaleza y que se ha producido por la mano del hombre. En modalidades particulares, un polinucleótido aislado es un

5 polinucleótido sintético, un polinucleótido semisintético, o un polinucleótido obtenido o derivado de una fuente recombinante.

En varias modalidades, un polinucleótido comprende un ARNm que codifica un polipéptido contemplado en la presente descripción. En ciertas modalidades, el ARNm comprende una caperuza, uno o más nucleótidos y una cola poli(A).

10 En modalidades particulares, los polinucleótidos pueden tener codones optimizados. Como se usa en la presente, el término "optimización de codones" se refiere a sustituir codones en un polinucleótido que codifica un polipéptido para aumentar la expresión, estabilidad y/o actividad del polipéptido. Los factores que influyen en la optimización de codones incluyen, pero sin limitarse a, uno o más de: (i) variación de los sesgos de codones entre dos o más organismos o

15 genes o tablas de sesgo construidas sintéticamente, (ii) variación en el grado de sesgo de codones dentro de un organismo, gen, o conjunto de genes, (iii) variación sistemática de codones, incluido el contexto, (iv) variación de codones de acuerdo con sus ARNt decodificantes, (v) variación de codones de acuerdo con % de GC, en general o en una posición del triplete, (vi) variación en el grado de similitud con una secuencia de referencia, por ejemplo, una secuencia

20 de origen natural, (vii) variación en el nivel de corte de frecuencia de codones, (viii) propiedades estructurales de los ARNm transcritos a partir de la secuencia de ADN, (ix) conocimiento previo sobre la función de las secuencias de ADN en las que se basa el diseño del conjunto de sustituciones de codones, (x) variación sistemática de conjuntos de codones para cada aminoácido y/o (xi) eliminación aislada de sitios de iniciación de la traducción falsa.

Los términos que describen la orientación de los polinucleótidos incluyen: 5' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo fosfato libre) y 3' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo hidroxilo libre (OH)). Las secuencias de polinucleótidos pueden anotarse en la orientación 5' a 3' o en la orientación 3' a 5'. Para el ADN y el ARNm, la cadena 5' a 3' se denomina cadena "sentido", "mayor" o "codificante" porque su secuencia es idéntica a la secuencia del premensajero (ARN_{prem}) [excepto por uracilo (U) en ARN, en lugar de timina (T) en ADN]. Para el ADN y el ARNm, la cadena complementaria 3' a 5' que es la cadena transcrita por la ARN polimerasa se denomina cadena "plantilla", "antisentido", "menor" o "no codificante". Como se usa en la presente, el término "orientación inversa" se refiere a una secuencia 5' a 3' escrita en la orientación 3' a 5' o una secuencia 3' a 5' escrita en la orientación 5' a 3'.

Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la cadena complementaria de la secuencia de ADN 5' A G T C A G 3' es 3' T C A G T A C 5'. La última secuencia se escribe frecuentemente como complemento inverso con el extremo 5' a la izquierda y el extremo 3' a la derecha, 5' C A T G A C T 3'. Se dice que una secuencia que es igual a su complemento inverso es una secuencia palindrómica. La complementariedad puede ser "parcial", en la que solo algunas de las bases de ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O, puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos.

Además, los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la redundancia del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido, o fragmento de variante del mismo, como se describe en la presente descripción. Algunos de estos polinucleótidos tienen homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones se

contemplan específicamente en la presente invención, por ejemplo, los polinucleótidos que se optimizan para la selección de codones humanos y/o de primates. Además, también pueden usarse alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente descripción. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos.

El término "casete de ácido nucleico" o "casete de expresión" como se usa en la presente se refiere a secuencias genéticas dentro de un vector que pueden expresar un ARN, y subsecuentemente una proteína. El casete de ácido nucleico contiene el gen de interés, por ejemplo, un polinucleótido de interés. El casete de ácido nucleico contiene una o más secuencias de control de la expresión, *por ejemplo*, un promotor, potenciador, secuencia poli(A), y un(os) gen(es) de interés, *por ejemplo*, un(os) polinucleótido(s) de interés. El casete de ácido nucleico se orienta posicional y secuencialmente dentro del vector de manera que el ácido nucleico en el casete puede transcribirse en ARN, y cuando sea necesario, traducirse en una proteína o un polipéptido, someterse a modificaciones postraduccionales apropiadas requeridas para la actividad en la célula transformada, y translocarse al compartimento apropiado para la actividad biológica al dirigirse a compartimentos intracelulares apropiados o secretarse en compartimentos extracelulares. En algunas modalidades, el casete tiene sus extremos 3' y 5' adaptados para la inserción lista en un vector, *por ejemplo*, tiene sitios de endonucleasa de restricción en cada extremo. En algunas modalidades, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de un receptor de antígeno quimérico. El casete puede retirarse e insertarse en un plásmido o vector viral como una única unidad.

En algunas modalidades, los polinucleótidos incluyen al menos un polinucleótido de interés. Como se usa en la presente descripción, el término "polinucleótido de interés" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido (*es decir*, un polipéptido de interés), insertado en un

vector de expresión que se desea expresar. Un vector puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 polinucleótidos de interés. En algunas modalidades, el polinucleótido de interés codifica un polipéptido que proporciona un efecto terapéutico en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno. Los polinucleótidos de interés, y los polipéptidos codificados a partir de estos, incluyen tanto polinucleótidos que codifican polipéptidos de tipo silvestre, así como también variantes funcionales y fragmentos de estos. En modalidades particulares, una variante funcional tiene al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad con una secuencia polinucleotídica o de polipéptido de referencia de tipo silvestre correspondiente. En algunas modalidades, una variante o fragmento funcional tiene al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de una actividad biológica de un polipéptido de tipo silvestre correspondiente.

Los polinucleótidos de la presente descripción, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí, pueden estar unidos a otras secuencias de ADN, como promotores y/o potenciadores, regiones no traducidas (UTR), secuencias de señal, secuencias Kozak, señales de poliadenilación, sitios adicionales de enzimas de restricción, múltiples sitios de clonación, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), sitios de reconocimiento de recombinasa (por ejemplo, LoxP, FRT y Att), codones de terminación, señales de terminación transcripcional, y polinucleótidos de autoescisión que codifican polipéptidos, etiquetas de epítipo, como se describe en otra parte de la presente descripción o como se conoce en la técnica, de manera que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que puede emplearse un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud, con la longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante previsto.

En algunas modalidades, un polinucleótido o célula que alberga el polinucleótido utiliza un gen

suicida, que incluye un gen suicida inducible para reducir el riesgo de toxicidad directa y/o proliferación no controlada. En algunas modalidades, el gen suicida no es inmunogénico para el huésped que alberga el polinucleótido o célula. Un cierto ejemplo de un gen suicida que puede usarse es la caspasa-9 o caspasa-8 o la citosina desaminasa. La caspasa-9 puede activarse mediante el uso de un inductor químico específico de dimerización (CID).

En algunas modalidades, los vectores comprenden segmentos génicos que provocan que las células efectoras inmunitarias de la invención, por ejemplo, las células T, sean susceptibles a la selección negativa *in vivo*. Por "selección negativa" se entiende que la célula infundida puede eliminarse como resultado de un cambio en la condición *in vivo* del individuo. El fenotipo de selección negativa puede resultar de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. Los genes de selección negativa se conocen en la técnica, e incluyen, entre otros, los siguientes: el gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple tipo I (HSV-I TK) (Wigler y otros, Cell 11:223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen celular de la hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT), el gen celular de la adenina fosforribosiltransferasa (APRT) y la citosina desaminasa bacteriana, (Mullen y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

En algunas modalidades, las células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente, tales como las células T, comprenden un polinucleótido que comprende además un marcador positivo que permite la selección de células del fenotipo de selección negativa *in vitro*. El marcador de selección positiva puede ser un gen que, al introducirse en la célula huésped, expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de células portadoras del gen. Los genes de este tipo se conocen en la técnica, e incluyen, entre otros, el gen de la higromicina-B fosfotransferasa (hph) que confiere resistencia a la higromicina B, el gen de la aminoglucósido de fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5 que codifica la resistencia al antibiótico G418, el gen de la dihidrofolato

reductasa (DHFR), el gen de la adenosina desaminasa (ADA) y el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR).

En algunas modalidades, el marcador de selección positiva y el elemento de selección negativa se unen de manera que la pérdida del elemento de selección negativa necesariamente también

5 se acompaña de la pérdida del marcador de selección positiva. En algunas modalidades, los marcadores de selección positiva y negativa se fusionan de manera que la pérdida de uno conduce obligatoriamente a la pérdida del otro. Un ejemplo de un polinucleótido fusionado que produce como producto de expresión un polipéptido que confiere las características de selección positiva y negativa deseadas descritas anteriormente es un gen de fusión de la higromicina

10 fosfotransferasa timidina cinasa (HyTK). La expresión de este gen produce un polipéptido que confiere resistencia a higromicina B para la selección positiva in vitro, y sensibilidad al ganciclovir para la selección negativa in vivo. Ver Lupton S. D., y otros, Mol. y Cell. Biology 1 1:3374- 3378, 1991. En algunas modalidades, los polinucleótidos que codifican los CAR están en vectores retrovirales que contienen el gen fusionado, particularmente aquellos que confieren resistencia a

15 higromicina B para la selección positiva in vitro, y sensibilidad al ganciclovir para la selección negativa in vivo, por ejemplo, el vector retroviral HyTK descrito en Lupton, S. D. y otros (1991), supra. Ver también las publicaciones de PCT US91/08442 y PCT/US94/05601, por S. D. Lupton, que describen el uso de genes de fusión de selección bifuncional derivados de la fusión de marcadores de selección positiva dominantes con marcadores de selección negativa.

20 En algunas modalidades de selección positiva preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en hph, nco y gpt, y los marcadores de selección negativa se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en citosina desaminasa, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT y gpt. En algunas modalidades, los marcadores son genes de fusión seleccionables bifuncionales en los que el marcador seleccionable positivo se deriva de hph o neo, y el marcador seleccionable

negativo se deriva de citosina deaminasa o un gen TK o marcador seleccionable. Genes suicidas inducibles

G. Vectores

Los polinucleótidos pueden prepararse, manipularse, y/o expresarse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Para expresar un polipéptido deseado, puede insertarse una secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido en un vector apropiado.

El término "vector" se usa en la presente descripción para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido se une generalmente a, por ejemplo, se inserta en la molécula de ácido nucleico vectorial. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma en una célula, o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula huésped.

Los vectores ejemplares incluyen, sin limitación, secuencias de replicación autónoma, ARNm, plásmidos (por ejemplo, plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales como el cromosoma artificial de levadura (YAC), el cromosoma artificial bacteriano (BAC), o el cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), bacteriófagos como el fago lambda o el fago M13, y virus animales. Los ejemplos de categorías de virus de animal útiles como vectores incluyen, sin limitación, retrovirus (que incluye lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (por ejemplo, SV40). Los ejemplos de vectores de expresión son vectores pCIneo (Promega) para la expresión en células de mamíferos; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia y expresión génica mediada por lentivirus en células de mamíferos. En algunas modalidades, las secuencias codificantes de las proteínas quiméricas aquí divulgadas pueden ligarse a dichos vectores de

expresión para la expresión de la proteína quimérica en células de mamífero.

En algunas modalidades, el vector es un vector episomal o un vector que se mantiene extracromosómicamente. Como se usa en la presente, el término "episomal" se refiere a un vector que es capaz de replicarse sin integración en el ADN cromosómico del huésped y sin pérdida gradual de una célula huésped que se divide, lo que significa además que dicho vector se replica extracromosómicamente o episomalmente. El vector está diseñado por ingeniería genética para albergar la secuencia que codifica el origen de la replicación del ADN o "ori" a partir de un virus del herpes linfotrófico o un herpesvirus gamma, un adenovirus, SV40, un virus del papiloma bovino o una levadura, específicamente un origen de replicación de un virus del herpes linfotrófico o un herpesvirus gamma correspondiente al oriP del EBV. En un aspecto particular, el virus del herpes linfotrófico puede ser el virus de Epstein Barr (EBV), el virus del herpes por sarcoma de Kaposi (KSHV), el virus del herpes saimiri (HS) o el virus de la enfermedad de Marek (MDV). El virus de Epstein Barr (EBV) y el virus del herpes sarcoma de Kaposi (KSHV) también son ejemplos de un herpesvirus gamma. Típicamente, la célula huésped comprende la proteína transactivadora de la replicación viral que activa la replicación.

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del origen de replicación vectorial, casetes de selección, promotores, potenciadores, señales de inicio de la traducción (secuencia de Shine Dalgarno o secuencia Kozak) intrones, una secuencia de poliadenilación, regiones 5' y 3' no traducidas que interactúan con proteínas celulares huésped para llevar a cabo la transcripción y traducción. Tales elementos pueden variar en su resistencia y especificidad. En dependencia del sistema vectorial y del huésped utilizado, puede usarse cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, que incluyen promotores ubicuos y promotores inducibles.

En algunas modalidades, los vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de expresión y

vectores virales, incluirán secuencias de control exógenas, endógenas o heterólogas tales como promotores y/o potenciadores. Una "secuencia de control endógena" es una que se une naturalmente con un gen dado en el genoma. Una "secuencia de control exógena" es una que se coloca en yuxtaposición a un gen por medio de manipulación genética (es *decir*, técnicas biológicas moleculares) de manera que la transcripción de ese gen es dirigida por el potenciador/promotor unido. Una "secuencia de control heteróloga" es una secuencia exógena que es de una especie diferente a la célula que se manipula genéticamente.

El término "promotor", como se usa en la presente, se refiere a un sitio de reconocimiento de un polinucleótido (ADN o ARN) al cual se une una ARN polimerasa. Una ARN polimerasa inicia y transcribe polinucleótidos unidos operativamente al promotor. En algunas modalidades, los promotores que operan en células de mamíferos comprenden una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases aguas arriba del sitio donde se inicia la transcripción y/u otra secuencia encontrada 70 a 80 bases aguas arriba desde el inicio de la transcripción, una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido.

El término "potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar una transcripción mejorada y en algunos casos puede funcionar independientemente de su orientación con relación a otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar de manera cooperativa o aditiva con promotores y/u otros elementos potenciadores. El término "promotor/potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar funciones promotoras y potenciadoras.

El término "unido operativamente", se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. En una modalidad, el término se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, y/o potenciador) y una segunda secuencia de

polinucleótidos, por ejemplo, un polinucleótido de interés, en donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Como se usa en la presente, el término "secuencia de control de la expresión constitutiva" se refiere a un promotor, potenciador o promotor/potenciador que permite continua o continuamente

5 la transcripción de una secuencia unida operativamente. Una secuencia de control de la expresión constitutiva puede ser un promotor, potenciador o promotor/potenciador "ubicuo" que permite la expresión en una amplia variedad de tipos de células y tejidos o un promotor, potenciador o promotor/potenciador "específico de células", "específico de tipo de células", "específico de linaje celular" o "específico de tejidos" que permite la expresión en una variedad restringida de tipos de
10 células y tejidos, respectivamente.

Las secuencias de control de la expresión ubicua ilustrativas adecuadas para su uso en modalidades de la invención particulares incluyen, pero sin limitarse a, un promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), un virus de simio viral 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tarde), un promotor de LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), una LTR del
15 virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor del virus del herpes simple (VHS) (timidina cinasa), promotores H5, P7.5, y P11 del virus vaccinia, un promotor del factor de alargamiento 1-alfa (EF1a), respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de iniciación de la traducción eucariota 4A1 (EIF4A1), proteína 5 choque térmico de 70 kDa (HSPA5), proteína de choque térmico beta
20 90 kDa, miembro 1 (HSP90B1), proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), β -cinesina (β -KIN), el locus ROSA 26 humano (Irions y otros, Nature Biotechnology 25, 1477 - 1482 (2007)), un promotor de Ubiquitina C (UBC), un promotor de fosfoglicerato cinasa-1 (PGK), un promotor de potenciador de citomegalovirus/actina β de pollo (CAG), un promotor de la β -actina y un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, región de control negativo eliminada,

promotor sustituido por sitio de unión al cebador (MND) dl587rev (Challita y otros, J Virol. 69(2):748-55 (1995)).

En algunas modalidades, un vector comprende un promotor de MND. En algunas modalidades, un vector comprende un promotor de EF1a que comprende el primer intrón del gen de EF1a humano. En algunas modalidades, un vector comprende un promotor de EF1a que carece del primer intrón del gen de EF1a humano.

En una modalidad particular, puede ser conveniente expresar un polinucleótido que comprende un CAR de un promotor específico de células T.

Como se usa en la presente, "expresión condicional" puede referirse a cualquier tipo de expresión condicional que incluye, pero sin limitarse a, expresión inducible; expresión reprimible; expresión en células o tejidos que tienen un estado fisiológico, biológico o de enfermedad particular, etc. Esta definición no pretende excluir la expresión específica de tipo celular o tejido. En algunas modalidades, la expresión condicional de un polinucleótido de interés, *por ejemplo*, la expresión se controla al someter una célula, tejido, organismo, etc., a un tratamiento o afección que provoca que se exprese el polinucleótido o que provoca un aumento o disminución en la expresión del polinucleótido codificado por el polinucleótido de interés.

Los ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles incluyen, pero sin limitarse a, promotores inducibles por esteroides tales como promotores para genes que codifican receptores de glucocorticoides o estrógenos (inducibles mediante el tratamiento con la hormona correspondiente), promotor de metalotionina (inducible mediante tratamiento con varios metales pesados), promotor de MX-1 (inducible por interferón), el sistema regulador de mifepristone "GeneSwitch" (Sirin y otros, 2003, Gene, 323:67), el intercambio génico inducible por cumato (WO 2002/088346), sistemas reguladores dependientes de tetraciclina, etc.

La expresión condicional también puede lograrse mediante el uso de una recombinasa de ADN

específica de sitio. De acuerdo con ciertas modalidades de la invención, el vector comprende al menos un (típicamente dos) sitio(s) para la recombinación mediada por una recombinasa específica de sitio. Como se usa en la presente, los términos "recombinasa" o "recombinasa específica de sitio" incluyen proteínas, enzimas, cofactores de escisión o integradoras o proteínas asociadas que participan en reacciones de recombinación que implican uno o más sitios de recombinación (*por ejemplo*, dos, tres, cuatro, cinco, séptimo, diez, doce, quince, veinte, treinta, cincuenta, *etc.*), que pueden ser proteínas de tipo silvestre (*ver* Landy, Current Opinion in Biotechnology 3:699-707 (1993)), o mutantes, derivados (*por ejemplo*, proteínas de fusión que contienen las secuencias de proteínas de recombinación o fragmentos de las mismas), fragmentos, y variantes de estos. Los ejemplos ilustrativos de recombinasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, Φ C31, Cin, Tn3 resolvasa, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1, y ParA.

Los vectores pueden comprender uno o más sitios de recombinación para cualquiera de una amplia variedad de recombinasas específicas de sitio. Debe entenderse que el sitio diana para una recombinasa específica de sitio es además de cualquier sitio requerido para la integración de un vector, por ejemplo, un vector retroviral o vector lentiviral. Como se usa en la presente, los términos "secuencia de recombinación", "sitio de recombinación" o "sitio de recombinación específica de sitio" se refieren a una secuencia de ácido nucleico particular a la que una recombinasa reconoce y se une.

Por ejemplo, un sitio de recombinación para la recombinasa Cre es loxP que es una secuencia de 34 pares de bases que comprende dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases (que sirven como los sitios de unión a la recombinasa) que flanquean una secuencia de núcleo de 8 pares de bases (*ver* la Figura 1 de Sauer, B., Current Opinion in Biotechnology 5:521-527 (1994)). Otros sitios loxP ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a: lox511 (Hoess y otros, 1996; Bethke y

Sauer, 1997), lox5171 (Lee y Saito, 1998), lox2272 (Lee y Saito, 1998), m2 (Langer y otros, 2002), lox71 (Albert y otros, 1995) y lox66 (Albert y otros, 1995).

Los sitios de reconocimiento adecuados para la recombinasa FLP incluyen, pero sin limitarse a: FRT (McLeod, y otros, 1996), F₁, F₂, F₃ (Schlake y Bode, 1994), F₄, F₅ (Schlake y Bode, 1994),
 5 FRT(LE) (Senecoff y otros, 1988), FRT(RE) (Senecoff y otros, 1988).

Otros ejemplos de secuencias de reconocimiento son las secuencias attB, attP, attL y attR, que son reconocidas por la enzima recombinasa λ Integrasa, por ejemplo, ϕ C31. El SSR ϕ C31 media la recombinación solo entre los sitios heterotípicos attB (34 pb de longitud) y attP (39 pb de longitud) (Groth y otros, 2000). attB y attP, denominados por los sitios de unión para la
 10 integrasa del fago en los genomas bacteriano y de fago, respectivamente, ambos contienen repeticiones invertidas imperfectas que probablemente se unen por homodímeros de ϕ C31 (Groth y otros, 2000). Los sitios del producto, attL y attR, son efectivamente inertes a la recombinación mediada por ϕ C31 adicional (Belteki y otros, 2003), lo que hace que la reacción sea irreversible. Para catalizar las inserciones, se ha descubierto que el ADN que porta attB se inserta en un sitio
 15 genómico de attP más fácilmente que un sitio de attP en un sitio genómico de attB (Thyagarajan y otros, 2001; Belteki y otros, 2003). Por lo tanto, las estrategias típicas se posicionan mediante recombinación homóloga en un "lugar de acoplamiento" que porta attP en un locus definido, que luego se asocia con una secuencia entrante que porta attB para su inserción.

Como se usa en la presente, un "sitio de entrada al ribosoma interno" o "IRES" se refiere a un
 20 elemento que promueve la entrada directa al ribosoma interno al codón de iniciación, tal como ATG, de un cistron (una región codificante de proteína), lo que conduce de esta manera la traducción independiente de caperuza del gen. Ver, por ejemplo, Jackson y otros, 1990. Trends Biochem Sci 15(12):477-83) y Jackson y Kaminski. 1995. RNA 1(10):985-1000. En algunas modalidades, los vectores incluyen uno o más polinucleótidos de interés que codifican uno o más

polipéptidos. En algunas modalidades, para lograr la traducción eficiente de cada uno de la pluralidad de polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos pueden separarse por una o más secuencias IRES o secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos autoescindibles.

Como se usa en la presente, el término "secuencia de Kozak" se refiere a una secuencia de nucleótidos corta que facilita en gran medida la unión inicial del ARNm a la subunidad pequeña del ribosoma y aumenta la traducción. La secuencia Kozak de consenso es (GCC)RCCATGG, donde R es una purina (A o G) (Kozak, 1986. Cell. 44(2):283-92, y Kozak, 1987. Nucleic Acids Res. 15(20):8125-48). En algunas modalidades, los polinucleótidos comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia consenso de Kozak y que codifican un polipéptido deseado, por ejemplo, un CAR.

1. Vectores virales

En algunas modalidades, una célula (*por ejemplo*, una célula efectora inmunitaria) se transduce con un vector viral, *por ejemplo*, un vector lentiviral, que codifica un CAR. Por ejemplo, una célula efectora inmunitaria se transduce con un vector que codifica un CAR que comprende un anticuerpo anti-MUC16 o fragmento de unión a antígeno de este que se une a un polipéptido MUC16, con un dominio de señalización intracelular de CD3ζ, CD28, 4-1BB, Ox40 o cualquiera de sus combinaciones. Por lo tanto, estas células transducidas pueden provocar una respuesta citotóxica mediada por CAR.

Los ejemplos ilustrativos de sistemas de vectores virales adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, virus adenoasociado (AAV), retrovirus, virus del herpes simple, adenovirus y vectores del virus vaccinia.

Los vectores basados en adenovirales son capaces de lograr una eficiencia de transducción muy alta en muchos tipos celulares y no requieren división celular. Con tales vectores, se han

obtenido altos títulos y altos niveles de expresión. Este vector puede producirse en grandes cantidades en un sistema relativamente simple. La mayoría de los vectores de adenovirus están modificados genéticamente de manera que un transgén reemplaza los genes de Ad E1a, E1b y/o E3; subsecuentemente, el vector con deficiencia de la replicación se propaga en las células humanas 293 que suministran la función génica eliminada en los trans. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos in vivo, que incluyen células diferenciadas sin división tales como las que se encuentran en hígado, riñón y músculo. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad de transporte.

La generación y propagación de los vectores de adenovirus actuales, que tienen deficiencia en la replicación, puede utilizar una línea celular asistente única, designada 293, que se transformó a partir de células renales embrionarias humanas mediante fragmentos de ADN de Ad5 y expresa constitutivamente proteínas E1 (Graham y otros, 1977). Dado que la región E3 es dispensable del genoma del adenovirus (Jones & Shenk, 1978), los vectores de adenovirus actuales, con la ayuda de células 293, portan ADN extraño ya sea en E1, D3 o ambas regiones (Graham & Prevec, 1991). Los vectores de adenovirus se han usado en la expresión génica eucariota (Levrero y otros, 1991; Gomez-Foix y otros, 1992) y el desarrollo de vacunas (Grunhaus & Horwitz, 1992; Graham & Prevec, 1992). Los estudios en la administración de adenovirus recombinante a diferentes tejidos incluyen instilación de tráquea (Rosenfeld y otros, 1991; Rosenfeld y otros, 1992), inyección muscular (Ragot y otros, 1993), inyecciones intravenosas periféricas (Herz & Gerard, 1993) e inoculación estereotáctica en el cerebro (Le Gal La Salle y otros, 1993). Un ejemplo del uso de un vector Ad en un ensayo clínico implicó la terapia con polinucleótidos para la inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Sternman y otros, Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998)).

En algunas modalidades, uno o más polinucleótidos que codifican un mensaje policistrónico

que codifica un CAR anti-MUC16 se introducen en una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T, transduciendo la célula con un virus adeno-asociado recombinante (rAAV), que comprende el uno o más polinucleótidos.

El AAV es un virus pequeño (~26 nm) no envuelto, principalmente episomal, con replicación defectuosa. El AAV puede infectar células divisorias y no divisorias y puede incorporar su
5 genoma en el de la célula huésped. El AAV recombinante (rAAV) se compone típicamente de, como mínimo, un transgén y sus secuencias reguladoras, y repeticiones terminales invertidas (RTI) de AAV 5' y 3'. Las secuencias de ITR tienen alrededor de 145 pb de longitud. En algunas modalidades, el rAAV comprende ITR y secuencias de cápside aisladas de AAV1, AAV2, AAV3,
10 AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10.

En algunas modalidades, se usa un rAAV quimérico, las secuencias de ITR se aíslan de un serotipo AAV y las secuencias de la cápside se aíslan de un serotipo AAV diferente. Por ejemplo, un rAAV con secuencias de ITR derivadas de AAV2 y secuencias de cápside derivadas de AAV6 se denomina AAV2/AAV6. En modalidades particulares, el vector de rAAV puede
15 comprender ITR de AAV2 y proteínas de la cápside de cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10. En algunas modalidades, el rAAV comprende secuencias de ITR derivadas de AAV2 y secuencias de cápside derivadas de AAV6. En algunas modalidades, el rAAV comprende secuencias de ITR derivadas de AAV2 y secuencias de cápside derivadas de AAV2.

20 En algunas modalidades, pueden aplicarse métodos de ingeniería genética y selección a las cápsides de AAV para aumentar la probabilidad de que transduzcan células de interés.

La construcción de vectores de rAAV, su producción y purificación se han divulgado, por ejemplo, en las patentes estadounidenses núm. 9,169,494; 9,169,492; 9,012,224; 8,889,641; 8,809,058; y 8,784,799, cada una de las cuales se incorpora por referencia en la presente

descripción en su totalidad.

En varias modalidades, uno o más polinucleótidos que codifican un CAR se introducen en una célula efectora inmunitaria al transducir la célula con un virus del herpes simple, por ejemplo, HSV-1, HSV-2, que comprende el uno o más polinucleótidos. En algunas modalidades, uno o
5 más polinucleótidos que codifican un mensaje policistrónico que codifica un CAR se introducen en una célula efectora inmunitaria mediante la transducción de la célula con un virus del herpes simple, por ejemplo, VHS-1, VHS-2, que comprende el uno o más polinucleótidos.

El virión maduro de VHS consiste en una cápsula icosaédrica envuelta con un genoma viral que consiste en una molécula de ADN lineal bicatenario que es de 152 kb. En una modalidad, el
10 vector viral basado en HSV es deficiente en uno o más genes de HSV esenciales o no esenciales. En una modalidad, el vector viral basado en HSV tiene deficiencia en la replicación.

La mayoría de los vectores de HSV con deficiencia en la replicación contienen una eliminación para eliminar uno o más genes de HSV intermedios-tempranos, tempranos o tardíos para evitar la replicación. Por ejemplo, el vector de HSV puede ser deficiente en un gen temprano inmediato
15 seleccionado del grupo que consiste en: ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 y sus combinaciones. Las ventajas del vector de HSV son su capacidad para entrar en una etapa latente que puede dar como resultado la expresión de ADN a largo plazo y su gran genoma de ADN viral que puede acomodar insertos de ADN exógenos de hasta 25 kb. Los vectores basados en HSV se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 5,837,532, 5,846,782 y
20 5,804,413, y las Solicitudes de Patente Internacional WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637 y WO 99/06583, cada uno de los cuales se incorpora por referencia en la presente descripción en su totalidad.

Los retrovirus son una herramienta común para el suministro de genes (Miller, 2000, *Nature*. 357: 455-460). En modalidades particulares, se usa un retrovirus para suministrar un polinucleótido

que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) a una célula. Como se usa en la presente, el término "retrovirus" se refiere a un virus de ARN que transcribe inversamente su ARN genómico en una copia lineal de ADN bicatenario y posteriormente integra covalentemente su ADN genómico en un genoma huésped. Una vez que el virus se integra en el genoma del huésped, se denomina "provirus". El provirus sirve como una plantilla para la ARN polimerasa II y dirige la expresión de moléculas de ARN que codifican las proteínas estructurales y enzimas necesarias para producir nuevas partículas virales.

Los retrovirus ilustrativos adecuados para su uso en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a: virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV), virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamífero murino (MuMTV), virus de la leucemia del simio gibón (GaLV), virus de la leucemia felina (FLV), spumavirus, virus de la leucemia murina de Friend, virus de las células madre murinas (MSCV) y virus del sarcoma de Rous (RSV) y lentivirus.

Como se usa en la presente, el término "lentivirus" se refiere a un grupo (o género) de retrovirus complejos. Los lentivirus ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a: HIV (virus de la inmunodeficiencia humana; incluidos HIV tipo 1 y HIV tipo 2); virus de la visna-maedi (VMV); virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV); virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); virus de la inmunodeficiencia felina (FIV); virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV). En una modalidad, se prefieren las cadenas principales de vectores basados en HIV (es decir, elementos de secuencia de acción cis del HIV). En algunas modalidades, se usa un lentivirus para suministrar un polinucleótido que comprende un CAR a una célula.

Los vectores retrovirales y más particularmente los vectores lentivirales pueden usarse en la práctica de modalidades particulares de la presente descripción. En consecuencia, el término

“retrovirus” o “vector retroviral”, como se usa en la presente descripción, pretende incluir “lentivirus” y “vectores lentivirales” respectivamente.

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

El término vector viral puede referirse ya sea a un virus o partícula viral capaz de transferir un ácido nucleico a una célula o al propio ácido nucleico transferido. Los vectores virales y los plásmidos de transferencia contienen elementos genéticos estructurales y/o funcionales que se derivan principalmente de un virus. El término “vector retroviral” se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de estos, que se derivan principalmente de un retrovirus. El término “vector lentiviral” se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de estos, que incluyen LTR que se derivan principalmente de un lentivirus. El término “vector híbrido” se refiere a un vector, LTR u otro ácido nucleico que contiene tanto secuencias retrovirales, *por ejemplo*, lentivirales, lentivirales, y secuencias virales no lentivirales. En una modalidad, un vector híbrido se refiere a un vector o plásmido de transferencia que comprende retroviral, *por ejemplo*, lentiviral, secuencias para transcripción inversa, replicación, integración y/o empaquetamiento.

En algunas modalidades, los términos “vector lentiviral”, “vector de expresión lentiviral” pueden usarse para referirse a plásmidos de transferencia lentiviral y/o partículas lentivirales infecciosas. Cuando se hace referencia en la presente descripción a elementos tales como sitios de clonación,

promotores, elementos reguladores, ácidos nucleicos heterólogos, *etc.*, debe entenderse que las secuencias de estos elementos están presentes en forma de ARN en las partículas lentivirales y están presentes en forma de ADN en los plásmidos de ADN.

En cada extremo del provirus hay estructuras llamadas “repeticiones terminales largas” o “LTR”.

- 5 El término "repetición terminal larga (LTR)" se refiere a dominios de pares de bases ubicados en los extremos de ADN retrovirales que, en su contexto de secuencia natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5. Las LTR generalmente proporcionan funciones fundamentales para la expresión de genes retrovirales (*por ejemplo*, promoción, iniciación y poliadenilación de transcritos génicos) y para la replicación viral. La LTR contiene numerosas
- 10 señales reguladoras que incluyen elementos de control transcripcional, señales de poliadenilación y secuencias necesarias para la replicación e integración del genoma viral. La LTR viral se divide en tres regiones llamadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos potenciadores y promotores. La región U5 es la secuencia entre el sitio de unión del cebador y la región R y contiene la secuencia de poliadenilación. La región R (repetir) está flanqueada por las
- 15 regiones U3 y U5. La LTR se compone de regiones U3, R y U5 y aparece en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Adyacente a la LTR 5' hay secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión al cebador de tARN) y para el empaquetamiento eficiente del ARN viral en partículas (el sitio Psi).

- 20 Como se usa en la presente, el término "señal de empaquetamiento" o "secuencia de empaquetamiento" se refiere a secuencias ubicadas dentro del genoma retroviral que se requieren para la inserción del ARN viral en la cápside o partícula viral, ver por ejemplo, Clever y otros, 1995. J. of Virology, Vol. 69, núm. 4; pp. 2101–2109. Varios vectores retrovirales usan la señal de empaquetamiento mínima (también denominada secuencia psi [Ψ]) necesaria para la encapsidación del genoma viral. Por lo tanto, como se usa en la presente descripción, los

términos “secuencia de empaquetamiento”, “señal de empaquetamiento”, “psi” y el símbolo “ Ψ ”, se usan en referencia a la secuencia no codificante requerida para la encapsidación de cadenas de ARN retroviral durante la formación de partículas virales.

- En varias modalidades, los vectores comprenden 5' LTR y/o 3' LTR modificadas. Cualquiera o
- 5 ambas de la LTR pueden comprender una o más modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, una o más deleciones, inserciones o sustituciones. Las modificaciones de la LTR 3' se realizan a menudo para mejorar la seguridad de los sistemas lentivirales o retrovirales al hacer que los virus sean defectuosos para la replicación. Tal como se utiliza en la presente descripción, el
- 10 término “defectuoso en la replicación” se refiere a virus que no son capaces de replicarse completa y eficazmente, de modo que no se producen viriones infecciosos (por ejemplo, progenie lentiviral de replicación defectuosa). El término “competente en la replicación” se refiere a un virus de tipo silvestre o virus mutante que es capaz de replicarse, de manera que la replicación viral del virus es capaz de producir viriones infecciosos (*por ejemplo*, progenie lentiviral competente en la replicación).
- 15 Los vectores “de autoinactivación” (SIN) se refieren a vectores con replicación defectuosa, por ejemplo, vectores retrovirales o lentivirales, en los que la región derecha (3') potenciadora-promotora de LTR, conocida como la región U3, se ha modificado (por ejemplo, por eliminación o sustitución) para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Esto se debe a que la región derecha (3') LTR U3 se usa como una plantilla para la región
- 20 izquierda (5') LTR U3 durante la replicación viral y, por lo tanto, el transcrito viral no puede realizarse sin el potenciador-promotor U3. En una modalidad adicional de la invención, la LTR 3' se modifica de manera que la región U5 se reemplaza, por ejemplo, con una secuencia poli(A) ideal. Se debe señalar que las modificaciones a las LTR tales como las modificaciones a la LTR 3', la LTR 5', o las LTR 3' y 5', también se incluyen en la invención.

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

En algunas modalidades, los vectores virales comprenden un elemento TAR. El término “TAR” se refiere al elemento genético de “respuesta a la transactivación” ubicado en la región R de las LTR lentivirales (*por ejemplo*, HIV). Este elemento interactúa con el elemento genético transactivador lentiviral (tat) para potenciar la replicación viral. Sin embargo, este elemento no se
20 requiere en modalidades en donde la región U3 de la LTR 5' se reemplaza por un promotor heterólogo.

La “región R” se refiere a la región dentro de las LTR retrovirales que comienza al inicio del grupo de tapado (*es decir*, el inicio de la transcripción) y termina inmediatamente antes del inicio del tracto poli A. La región R también se define como flanqueada por las regiones U3 y U5. La región

R desempeña un papel durante la transcripción inversa en permitir la transferencia de ADN naciente de un extremo del genoma al otro.

Como se usa en la presente, el término "elemento FLAP" o "cPPT/FLAP" se refiere a un ácido nucleico cuya secuencia incluye el tracto de polipurina central y secuencias de terminación central (cPPT y CTS) de un retrovirus, por ejemplo, HIV-1 o HIV-2. Los elementos FLAP adecuados se describen en la patente de Estados Unidos núm. 6,682,907 y en Zennou, y otros, 2000, Cell, 101:173. Durante la transcripción inversa del HIV-1, el inicio central del ADN de cadena positiva en el tracto de polipurina central (cPPT) y la terminación central en la secuencia de terminación central (CTS) conducen a la formación de una estructura de ADN tricaténaria: el colgajo de ADN central del HIV-1. Si bien no desea unirse a ninguna teoría, la aleta de ADN puede actuar como un determinante cisactivo de la importación nuclear del genoma lentiviral y/o puede aumentar el título del virus. En modalidades particulares, las estructuras principales de vectores retrovirales o lentivirales comprenden uno o más elementos FLAP aguas arriba o aguas abajo de los genes heterólogos de interés en los vectores. Por ejemplo, en modalidades particulares un plásmido de transferencia incluye un elemento FLAP. En una modalidad, un vector de la invención comprende un elemento FLAP aislado de HIV-1. En otra modalidad, un vector lentiviral contiene un elemento FLAP con una o más mutaciones en los elementos cPPT y/o CTS. Aún en otra modalidad, un vector lentiviral comprende un elemento cPPT o CTS. En aún otra modalidad, un vector lentiviral no comprende un elemento cPPT o CTS.

En algunas modalidades, los vectores de transferencia retroviral o lentiviral comprenden uno o más elementos de exportación. La expresión "elemento de exportación" se refiere a un elemento regulador postranscripcional de acción cis que regula el transporte de un transcrito de ARN desde el núcleo hasta el citoplasma de una célula. Los ejemplos de elementos de exportación de ARN incluyen, pero sin limitarse a, el elemento de respuesta rev (RRE) del virus de la

inmunodeficiencia humana (HIV) (ver, por ejemplo, Cullen y otros, 1991. J. Virol. 65: 1053; y Cullen y otros, 1991. Cell 58: 423) y el elemento regulador postranscripcional (HPRE) del virus de la hepatitis B. Generalmente, el elemento de exportación de ARN se coloca dentro de la UTR 3' de un gen, y puede insertarse como una o múltiples copias.

- 5 En algunas modalidades, la expresión de secuencias heterólogas en vectores virales aumenta al incorporar elementos reguladores postranscripcionales, sitios de poliadenilación eficientes y, opcionalmente, señales de terminación de la transcripción en los vectores. Una variedad de elementos reguladores postranscripcionales puede aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo en la proteína, por ejemplo, un elemento regulador postranscripcional del virus de la
- 10 hepatitis de la marmota (WPRE; Zufferey y otros, 1999, J. Virol., 73:2886); el elemento regulador postranscripcional presente en el virus de la hepatitis B (HPRE) (Huang y otros, Mol. Cell. Biol., 5:3864); y similares (Liu y otros, 1995, Genes Dev., 9:1766). En algunas modalidades, los vectores comprenden un elemento regulador postranscripcional tal como un WPRE o HPRE
- 15 En algunas modalidades, los vectores carecen o no comprenden un elemento regulador postranscripcional (PTE) tal como un WPRE o HPRE porque en algunos casos estos elementos aumentan el riesgo de transformación celular y/o no aumentan sustancialmente o significativamente la cantidad de transcrito de ARNm o aumentan la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, en algunas modalidades, los vectores carecen o no comprenden un PTE. En algunas modalidades, los vectores carecen o no comprenden un WPRE o HPRE como una medida de
- 20 seguridad añadida.

Los elementos que dirigen la terminación y poliadenilación eficientes de los transcritos de ácidos nucleicos heterólogos aumentan la expresión génica heteróloga. Las señales de terminación de la transcripción se encuentran generalmente aguas abajo de la señal de poliadenilación. En modalidades particulares, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un

polinucleótido que codifica un polipéptido a expresar. El término "sitio poliA" o "secuencia poliA" como se usa en la presente descripción indica una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación del transcrito de ARN naciente por la ARN polimerasa II. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm mediante la adición de una cola de poliA al extremo 3' de la secuencia codificante y, por lo tanto, contribuir a una mayor eficiencia de traducción. La poliadenilación eficiente del transcrito recombinante es conveniente ya que los transcritos que carecen de una cola poli A son inestables y se degradan rápidamente. La escisión y la poliadenilación se dirigen mediante una secuencia poli(A) en el ARN. La secuencia poli(A) de núcleo para pre-ARNm de mamíferos tiene dos elementos de reconocimiento que flanquean un sitio de escisión-poliadenilación. Típicamente, un hexámero AAUAAA casi invariante se encuentra en 20-50 nucleótidos corriente arriba de un elemento más variable rico en residuos U o GU. La escisión del transcrito naciente se produce entre estos dos elementos y se acopla a la adición de hasta 250 adenosinas al producto de escisión 5'. Los ejemplos ilustrativos de señales poliA que pueden usarse en un vector de la invención incluyen una secuencia poliA ideal (*por ejemplo*, AATAAA, ATATAA, AGTAAA), una secuencia poliA de hormona de crecimiento bovina (BGHpA), una secuencia poliA de β -globina de conejo (r β gpA), u otra secuencia poliA heteróloga o endógena adecuada conocida en la técnica.

En algunas modalidades, un vector retroviral o lentiviral comprende además uno o más elementos aislantes. Los elementos aislantes pueden contribuir a proteger las secuencias expresadas con lentivirus, *por ejemplo*, polipéptidos terapéuticos, de los efectos del sitio de integración, que pueden estar mediados por elementos de acción cis presentes en el ADN genómico y conducir a la expresión desregulada de las secuencias transferidas (*es decir*, efecto de posición; *ver, por ejemplo*, Burgess-Beusse y otros, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci., Estados Unidos*, 99:16433; y Zhan y otros, 2001, *Hum. Genet.*, 109:471). En algunas modalidades, los vectores de transferencia

comprenden uno o más elementos aislantes de la LTR 3' y, tras la integración del provirus en el genoma del huésped, el provirus comprende uno o más aislantes tanto en la LTR 5' como en la LTR 3', en virtud de duplicar la LTR 3'. Los aislantes adecuados para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, el aislante de β -globina de pollo (ver Chung y otros, 1993. Cell 74:505; Chung y otros, 1997. PNAS 94:575; y Bell y otros, 1999. Cell 98:387, incorporada como referencia en la presente descripción). Los ejemplos de elementos aislantes incluyen, pero no se limitan a, un aislante de un locus de β -globina, tal como HS4 de pollo.

En algunas modalidades, la mayoría o todas las secuencias de la cadena principal del vector viral se derivan de un lentivirus, *por ejemplo*, HIV-1. Sin embargo, debe entenderse que pueden usarse muchas fuentes diferentes de secuencias retrovirales y/o lentivirales, o combinarse y numerosas sustituciones y alteraciones en ciertas de las secuencias lentivirales pueden acomodarse sin afectar la capacidad de un vector de transferencia para realizar las funciones descritas en la presente descripción. Además, una variedad de vectores lentivirales se conocen en la técnica, ver Naldini y otros, (1996a, 1996b y 1998); Zufferey y otros, (1997); Dull y otros, 1998, patente de Estados Unidos núms. 6,013,516; y 5,994,136, muchos de los cuales pueden adaptarse para producir un vector viral o plásmido de transferencia.

En algunas modalidades, los vectores comprenden un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido CAR. Los vectores pueden tener una o más LTR, en donde cualquiera de las LTR comprende una o más modificaciones, tales como una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos. Los vectores pueden comprender además uno o más elementos accesorios para aumentar la eficiencia de la transducción (*por ejemplo*, un cPPT/FLAP), el empaquetamiento viral (*por ejemplo*, una señal de empaquetamiento Psi (Ψ), RRE) y/u otros elementos que aumentan la expresión génica terapéutica (*por ejemplo*, secuencias poli (A)), y pueden comprender opcionalmente un WPRE o HPRE.

En varias modalidades, el vector es un vector viral de integración.

En varias otras modalidades, el vector es un vector viral episomal o no integral.

En varias modalidades, los vectores contemplados en la presente descripción, comprenden retrovirus defectuosos no integrales o de integración. Tal como se utiliza aquí, el término “de

5 replicación defectuosa” se refiere a virus que no son capaces de replicarse completa y eficazmente, de modo que no se producen viriones infecciosos (por ejemplo, progenie lentiviral de replicación defectuosa). En varias modalidades, la proteína integrasa se muta para disminuir específicamente su actividad integrasa. Los vectores lentivirales incompetentes en la integración se obtienen modificando el gen pol que codifica la proteína integrasa, lo que da como resultado
10 un gen pol mutado que codifica una integrasa deficiente integrativa. Tales vectores virales incompetentes en la integración se han descrito en la solicitud de patente WO 2006/010834, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Las mutaciones ilustrativas en el gen de pol de HIV-1 adecuadas para reducir la actividad de la integrasa incluyen, pero sin limitarse a: H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R, D41A, K42A, H51A,

15 Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199c, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A y K264H.

20 Las mutaciones ilustrativas en el gen de pol de HIV-1 adecuadas para reducir la actividad de la integrasa incluyen, pero sin limitarse a: D64E, D64V, E92K, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, W235F, y W235E.

En una modalidad particular, una integrasa comprende una mutación en uno o más de aminoácidos, D64, D116 o E152. En una modalidad, una integrasa comprende una mutación en

los aminoácidos D64, D116 y E152. En una modalidad particular, una integrasa del HIV-1 defectuosa comprende una mutación D64V.

Una “célula huésped” incluye células electroporadas, transfectadas, infectadas o transducidas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la invención. Las células huésped pueden incluir células de empaquetamiento, células productoras y células infectadas con vectores virales. En modalidades particulares, las células huésped infectadas con el vector viral de la invención se administran a un sujeto que necesita terapia. En ciertas modalidades, el término “célula diana” se usa indistintamente con célula huésped y se refiere a células transfectadas, infectadas o transducidas de un tipo de célula deseado. En modalidades preferidas, la célula diana es una célula T.

Los vectores virales que comprenden polinucleótidos contemplados en modalidades particulares pueden suministrarse *in vivo* mediante la administración a un paciente individual, típicamente mediante administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica, como se describe a continuación. Alternativamente, los vectores pueden suministrarse a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, sangre periférica movilizada, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido, etc.) o células madre hematopoyéticas universales del donante, seguido de la reimplantación de las células en un paciente.

En una modalidad, un vector viral que comprende un polinucleótido que codifica un CAR se administra directamente a un organismo para la transducción de células *in vivo*. La administración se realiza por cualquiera de las vías normalmente usadas para introducir una molécula en contacto final con células sanguíneas o tisulares que incluyen, pero sin limitarse a, inyección, infusión, aplicación tópica y electroporación. Los métodos adecuados para administrar tales ácidos nucleicos están disponibles y son bien conocidos por los expertos en la técnica, y, aunque

puede usarse más de una ruta para administrar una composición particular, una ruta particular frecuentemente puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta.

La producción de partículas virales a gran escala a menudo es necesaria para lograr un título viral razonable. Las partículas virales se producen transfectando un vector de transferencia en una

5 línea celular de empaquetamiento que comprende genes virales estructurales y/o accesorios, por ejemplo, genes gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx, o nef u otros genes retrovirales.

Como se usa en la presente descripción, el término “vector de empaquetamiento” se refiere a un vector de expresión o vector viral que carece de una señal de empaquetamiento y comprende un polinucleótido que codifica uno, dos, tres, cuatro o más genes estructurales y/o accesorios virales.

10 Típicamente, los vectores de empaquetamiento se incluyen en una célula de empaquetamiento, y se introducen en la célula mediante transfección, transducción o infección. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para la transfección, transducción o infección. Un vector de transferencia retroviral/lentiviral de la presente invención puede introducirse en una línea celular de empaquetamiento, mediante transfección, transducción o infección, para generar una célula o

15 línea celular productora. Los vectores de empaquetamiento de la presente invención pueden introducirse en células humanas o líneas celulares mediante métodos estándar que incluyen, *por ejemplo*, transfección, lipofección o electroporación con fosfato cálcico. En algunas modalidades, los vectores de empaquetamiento se introducen en las células junto con un marcador de selección dominante, tal como neomicina, higromicina, puromicina, blastocidina, zeocina, timidina cinasa,

20 DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido de la selección en presencia del fármaco apropiado y el aislamiento de los clones. Un gen marcador de selección puede unirse físicamente a genes que codifican por el vector de empaquetamiento, *por ejemplo*, mediante IRES o péptidos virales autoescindibles.

Las proteínas de la envoltura viral (env) determinan el intervalo de células huésped que finalmente

pueden infectarse y transformarse mediante retrovirus recombinantes generados a partir de las líneas celulares. En el caso de lentivirus, tales como HIV-1, HIV-2, SIV, FIV y EIV, las proteínas env incluyen gp41 y gp120. Preferentemente, las proteínas env virales expresadas por el empaquetamiento de células de la invención se codifican en un vector separado de los genes

5 nauseosos virales y pol, como se ha descrito anteriormente.

Los ejemplos ilustrativos de genes env derivados de virus que pueden emplearse en la invención incluyen, pero no se limitan a: Envolturas MLV, envoltura 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, Ébola, Sendai, FPV (Vírido de la peste de Fowl) y envolturas del virus de la influenza. De manera similar, pueden utilizarse genes que codifican envolturas a partir de virus de ARN (*por ejemplo*,

10 familias de virus de ARN de Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae), así como también de los virus de ADN (familias de Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxiiridae e Iridoviridae). Los ejemplos representativos incluyen , FeLV, VEE,

15 HFVW, WDSV, SFV, Rabies, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10, y EIAV.

En otras modalidades, las proteínas de la envoltura para seudotipar un virus de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes virus: Gripe A tal como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (flue de aves), Gripe B, virus de la influenza C, Virus de la hepatitis

20 A, Virus de la hepatitis B, Virus de la hepatitis C, Virus de la hepatitis D, Virus de la hepatitis E, Rotavirus, cualquier virus del grupo del virus Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, Virus de la fiebre del dengue, Cangrejo de mono, Mononegavirales, Lissavirus como el virus de la rabia, virus batido de Lagos, virus de Mokola, Virus del Duvenhage, virus del bacalao europeo 1 y 2 y virus del bacalao Australiano, Ephemerovirus, Vesiculovirus, Virus de la estomatitis vesicular

(VSV), Herpesvirus como el virus del herpes simple tipos 1 y 2, zoster de varicela, citomegalovirus, Virus de Epstein-Bar (EBV), virus del herpes humano (HIV), el herpesvirus humano tipo 6 y 8, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus del papiloma, gammaherpesvirus murino, Viruses como el virus de la fiebre hemorrágica argentina, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, Virus de la fiebre hemorrágica asociado a Sabia, Virus de la fiebre hemorrágica de Takeda, virus de la fiebre de Lassa, Virus Machupo, Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), Bunyaviridae como el virus de la fiebre hemorrágica Crimidia-Congo, Hantavirus, fiebre hemorrágica con síndrome renal que causa virus, virus de la fiebre de Rift Valley, Filoviridae (filovirus) que incluye fiebre hemorrágica del Ébola y fiebre hemorrágica de Marburgo, Flaviviridae, incluido el virus de la enfermedad de Kaysanur, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, Encefalitis transmitida por la mecha que causa virus y Paramyxoviridae tales como virus Hendra y virus Nipah, la variola mayor y la variola menor (virola pequeña), alfavirus tales como el virus de la encefalitis equina venezolana, Virus de la encefalitis equina oriental, Virus de la encefalitis equina occidental, coronavirus asociado al virus SARS (SARS-CoV), Virus del Nilo Occidental, cualquier encefalitis que provoque virus.

En una modalidad, la invención proporciona el empaquetamiento de células que producen retrovirus recombinante, *por ejemplo*, lentivirus, pseudotipado con la glicoproteína VSV-G.

Los términos "pseudotipo" o "pseudotipado" como se usan en la presente, se refieren a un virus cuyas proteínas de la envoltura viral se han sustituido con las de otro virus que posee características preferibles. Por ejemplo, el VIH puede pseudotiparse con proteínas de la envoltura de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), lo que permite que el VIH infecte un intervalo más amplio de células porque las proteínas de la envoltura del VIH (codificadas por el gen de env) normalmente se dirigen al virus a las células presentadoras de CD4+. En una modalidad preferida de la invención, las proteínas de la envoltura lentiviral se pseudotipifican con

VSV-G. En una modalidad, la invención proporciona el empaquetamiento de células que producen retrovirus recombinante, *por ejemplo*, lentivirus, pseudotipado con la glicoproteína de envoltura VSV-G.

Como se usa en la presente descripción, el término “envasar líneas celulares” se usa en referencia a líneas celulares que no contienen una señal de empaque, pero que expresan de manera estable o transitoria proteínas estructurales virales y enzimas de replicación (*por ejemplo*, *nauseoso*, *pol* y *env*) que son necesarias para el empaquetamiento correcto de partículas virales. Cualquier línea celular adecuada puede emplearse para preparar las celdas de empaquetamiento de la invención. Generalmente, las células son células de mamíferos. En una modalidad particular, las células usadas para producir la línea celular de empaquetamiento son células humanas. Las líneas celulares adecuadas que pueden usarse incluyen, *por ejemplo*, células CHO, células BHK, células MDCK, células C3H 10T1/2, células FLY, células Psi-2, células BOSC 23, células PA317, células WEHI, células COS, células BSC 1, células BSC 40, células BMT 10, células VERO, células W138, células MRC5, células A549, células HT1080, células 293, células 293T, células B-50, células 3T3, células NIH3T3, células HepG2, células Saos-2, células Huh7, células HeLa, células W163, células 211 y células 211A. En modalidades preferidas, las células de empaquetamiento son 293 células, 293T o células A549. En otra modalidad preferida, las células son células A549.

Como se usa en la presente descripción, el término “línea celular productora” se refiere a una línea celular que es capaz de producir partículas retrovirales recombinantes, que comprende una línea celular de empaquetamiento y un constructo vector de transferencia que comprende una señal de empaquetamiento. La producción de partículas virales infecciosas y soluciones madre virales puede llevarse a cabo mediante el uso de técnicas convencionales. Los métodos para preparar soluciones madre virales se conocen en la técnica y se ilustran por, *por ejemplo*, Y.

Soneoka y otros (1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628-633, y N. R. Landau y otros (1992) *J. Virol.* 66:5110-5113. Las partículas de virus infecciosas pueden recogerse de las células de empaquetamiento mediante el uso de técnicas convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas pueden recogerse mediante lisis celular, o recogida del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas de virus recogidas pueden purificarse si se desea. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas de purificación adecuadas.

El suministro de un gen(s) u otra secuencia de polinucleótidos mediante el uso de un vector retroviral o lentiviral por medio de infección viral en lugar de por transfección se denomina “transducción”. En una modalidad, los vectores retrovirales se transducen en una célula a través de la integración de infección y provirus. En ciertas modalidades, una célula diana, *por ejemplo*, una célula T, se “transduce” si comprende un gen u otra secuencia de polinucleótidos suministrada a la célula por infección mediante el uso de un vector viral o retroviral. En modalidades particulares, una célula transducida comprende uno o más genes u otras secuencias de polinucleótidos suministradas por un vector retroviral o lentiviral en su genoma celular.

En modalidades particulares, las células huésped transducidas con el vector viral de la invención que expresa uno o más polipéptidos, se administran a un sujeto para tratar y/o prevenir enfermedades. Otros métodos relacionados con el uso de vectores virales en terapia génica, que pueden utilizarse de acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, pueden encontrarse en, *por ejemplo*, Kay, M. A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. y Heard, J. M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975-81; Shiratory, Y. y otros (1999) *Liver* 19:265-74; Oka, K. y otros (2000) *Curr. Opinión. Lipidol.* 11:179-86; Thule, P. M. y Liu, J. M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56; Alt, M. (1995) *J. Hepatol.* 23:746-58; Brody, S. L. y Crystal, R. G. (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) *Experto*

Opin. Investigación. Drugs 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. y Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43-49; y Lee, H. C. y otros (2000) *Nature* 408:483-8.

CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

- En algunas modalidades, la descripción proporciona células modificadas genéticamente para
- 5 expresar los CAR contemplados en la presente descripción. En algunas modalidades, las células modificadas genéticamente son para su uso en el tratamiento del cáncer (*por ejemplo*, cáncer que expresa MUC16). Como se usa en la presente, el término "manipulado genéticamente" o "modificado genéticamente" se refiere a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula. Los términos, "células modificadas
- 10 genéticamente", "células modificadas" y "células redirigidas", se usan indistintamente. Como se usa en la presente descripción, el término "terapia génica" se refiere a la introducción de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula que restaura, corrige o modifica la expresión de un gen, o con el propósito de expresar un polipéptido terapéutico, *por ejemplo*, un CAR.
- 15 En algunas modalidades, los CAR contemplados en la presente descripción se introducen y expresan en células efectoras inmunitarias para redirigir su especificidad a un antígeno diana de interés, *por ejemplo*, un polipéptido MUC16. Una "célula efectora inmunitaria", es cualquier célula del sistema inmunitario que tenga una o más funciones efectoras (por ejemplo, actividad de destrucción de células citotóxicas, secreción de citocinas, inducción de ADCC y/o CDC).
- 20 Las células efectoras inmunitarias de la invención pueden ser autólogas/autogénicas ("uno mismo") o no autólogas ("no propio", *por ejemplo*, alogénicas, singénicas o xenogénicas). "Autólogas", como se usa en la presente, se refiere a células del mismo sujeto. "Alogénicas", como se usa en la presente, se refiere a células de la misma especie que difieren genéticamente de la célula en comparación. "Singénicas", como se usa en la presente, se refiere a células de un

sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación. "Xenogénicas", como se usa en la presente, se refiere a células de una especie diferente a la célula en comparación. En modalidades preferidas, las células de la invención son alogénicas.

Las células efectoras inmunitarias ilustrativas usadas con los CAR contemplados en la presente descripción incluyen linfocitos T. Los términos "células T" o "linfocitos T" son reconocidos en la técnica y están destinados a incluir timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo o linfocitos T activados. Una célula T puede ser una célula T auxiliar (Th), por ejemplo una célula T auxiliar 1 (Th1) o T auxiliar 2 (Th2). La célula T puede ser una célula T auxiliar (HTL; célula T CD4⁺) célula T CD4⁺, una célula T citotóxica (CTL; célula T CD8⁺), célula T CD4⁺CD8⁺, célula T CD4⁺CD8⁻ o cualquier otro subconjunto de células T. Otras poblaciones ilustrativas de células T adecuadas para su uso en modalidades particulares incluyen células T inexpertas (TN), células T de memoria, células madre de memoria T (TSCM), células T de memoria central (TCM), células T de memoria efectoras (TEM) y células T efectoras (TEFF).

Como comprenderá el experto, también pueden utilizarse otras células como células efectoras inmunitarias con los CAR descritos en la presente descripción. En particular, las células efectoras inmunitarias también incluyen células NK, células NKT, neutrófilos y macrófagos. Las células efectoras inmunitarias también incluyen progenitoras de células efectoras en donde tales células progenitoras pueden inducirse para diferenciarse en células efectoras inmunitarias *in vivo* o *in vitro*. Por lo tanto, en algunas modalidades, la célula efectora inmunitaria incluye progenitoras de células efectoras inmunitarias tales como células madre hematopoyéticas (HSC) contenidas dentro de la población CD34⁺ de células derivadas de sangre de cordón, médula ósea o sangre periférica movilizada que tras la administración en un sujeto se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras, o que pueden inducirse *in vitro* para diferenciarse en células efectoras inmunitarias maduras.

En el presente documento, las células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente para contener CAR específicos de MUC16 pueden denominarse “células efectoras inmunitarias redirigidas específicas de MUC16”.

La expresión, "célula CD34+", como se usa en la presente, se refiere a una célula que expresa la proteína CD34 en su superficie celular. "CD34", como se usa en la presente descripción, se refiere a una glicoproteína de superficie celular (por ejemplo, proteína sialomucina) que frecuentemente actúa como un factor de adhesión celular y está implicada en la entrada de células T en los ganglios linfáticos. La población de células CD34+ contiene células madre hematopoyéticas (HSC), que tras la administración a un paciente se diferencian y contribuyen a todos los linajes hematopoyéticos, incluidas las células T, las células NK, las células NKT, los neutrófilos y las células del linaje de monocitos/macrófagos.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para producir las células efectoras inmunitarias que expresan el CAR contemplado en la presente descripción. En algunas modalidades, el método comprende transfectar o transducir células efectoras inmunitarias aisladas de un individuo de manera que las células efectoras inmunitarias expresen uno o más CAR como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, las células efectoras inmunitarias se aíslan de un individuo y se modifican genéticamente sin manipulación adicional in vitro. Tales células pueden entonces volver a administrarse directamente a la persona. En modalidades adicionales, las células efectoras inmunitarias se activan y estimulan primero para proliferar in vitro antes de modificarse genéticamente para expresar un CAR. A este respecto, las células efectoras inmunitarias pueden cultivarse antes y/o después de ser modificadas genéticamente (es decir, transducidas o transfectadas para expresar un CAR contemplado en la presente descripción).

En algunas modalidades, antes de la manipulación o modificación genética in vitro de las células

efectoras inmunitarias descritas en la presente descripción, la fuente de células se obtiene de un sujeto. En algunas modalidades, las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR comprenden células T. Las células T pueden obtenerse a partir de una serie de fuentes que incluyen, pero sin limitarse a, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En algunas modalidades, las células T pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre recolectada de un sujeto mediante el uso de cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como la sedimentación, por ejemplo, separación con FICOLL™. En algunas modalidades, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen mediante una fisilación. El producto de asorción típicamente contiene linfocitos, que incluyen células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En algunas modalidades, las células recolectadas por asorción pueden lavarse para eliminar la fracción plasmática y colocar las células en un tampón o medio apropiado para el procesamiento posterior. Las células pueden lavarse con PBS o con otra solución adecuada que carezca de calcio, magnesio y la mayoría, si no todos los demás, de cationes divalentes. Como apreciarán los expertos en la técnica, una etapa de lavado puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como mediante el uso de una centrífuga de flujo semiautomatizada. Por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el citoMate de Cooko, o similares. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles u otra solución salina con o sin tampón. En algunas modalidades, los componentes indeseables de la muestra de asorción pueden eliminarse en el medio de cultivo de la célula directamente resuspendido.

En algunas modalidades, las células T se aíslan de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante el lisado de los glóbulos rojos y la reducción de los monocitos, por ejemplo,

mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Subpoblación específica de células T que expresan uno o más de los siguientes marcadores: CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO, pueden aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En una modalidad, una subpoblación específica de células T, que expresan CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO se aísla además mediante técnicas de selección positivas o negativas. Por ejemplo, el enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa puede lograrse con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores superficiales únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método para su uso en la presente descripción es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que usa un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. La citometría de flujo y la clasificación celular también pueden usarse para aislar poblaciones celulares de interés para su uso en la presente invención.

Las PBMC pueden modificarse genéticamente directamente para expresar CAR mediante el uso de métodos contemplados en la presente descripción. En algunas modalidades, tras el aislamiento de PBMC, los linfocitos T se aíslan aún más y, en ciertas realizaciones, tanto los linfocitos T citotóxicos como los linfocitos T auxiliares pueden clasificarse en subpoblaciones de células T sin tratamiento previo, de memoria y efectoras, ya sea antes o después de la modificación genética y/o la expansión.

Las células CD8⁺ pueden obtenerse mediante el uso de métodos estándar. En algunas modalidades, las células CD8⁺ se clasifican adicionalmente en células sin tratamiento previo, de memoria central y efectoras mediante la identificación de antígenos de superficie celular que se

asocian con cada uno de esos tipos de células CD8⁺.

En algunas modalidades, los linfocitos T CD8⁺ vírgenes se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de células T sin tratamiento previo que incluyen CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 y CD45RA.

- 5 En algunas modalidades, las células T de memoria están presentes tanto en los subconjuntos CD62L⁺ como CD62L⁻ de linfocitos CD8⁺ en sangre periférica. La PBMC se clasifica en fracciones CD62L⁻CD8⁺ y CD62L⁺CD8⁺ después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas modalidades, la expresión de marcadores fenotípicos de células T de memoria central incluye CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativas para granzima B. En
- 10 algunas modalidades, las células T de memoria central son células T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺. En algunas modalidades, las células T efectoras son negativas para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivas para granzima B y perforina.

- En algunas modalidades, las células T CD4⁺ se clasifican adicionalmente en subpoblaciones. Por ejemplo, las células T cooperadoras CD4⁺ pueden clasificarse en células sin tratamiento previo,
- 15 de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4⁺ pueden obtenerse mediante métodos estándar. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento previo son células T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ CD4⁺. En algunas modalidades, las células CD4⁺ de memoria central son positivas para CD62L y positivas para CD45RO. En algunas modalidades, las células
 - 20 efectoras CD4⁺ son negativas para CD62L y CD45RO.

Las células efectoras inmunitarias, tales como las células T, pueden modificarse genéticamente después del aislamiento mediante el uso de métodos conocidos, o las células efectoras inmunitarias pueden activarse y expandirse (o diferenciarse en el caso de progenitoras) *in vitro* antes de modificarse genéticamente. En algunas modalidades, las células efectoras inmunitarias,

tales como las células T, se modifican genéticamente con los receptores de antígeno quimérico contemplados en la presente descripción (*por ejemplo*, transducidas con un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR) y luego se activan y expanden *in vitro*. En varias modalidades, las células T pueden activarse y expandirse antes o después de la

5 modificación genética para expresar un CAR, mediante el uso de métodos como se describió, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 20060121005.

10 Generalmente, las células T se expanden mediante el contacto con una superficie que se une a ellas a un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3 TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. Las poblaciones de células T pueden estimularse mediante el contacto con un anticuerpo anti-CD3, o fragmento de unión al antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o mediante

15 el contacto con un activador de la proteína cinasa C (*por ejemplo*, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. También se contempla la coestimulación de moléculas accesorios en la superficie de las células T.

En algunas modalidades, las PBMC o células T aisladas se ponen en contacto con un agente estimulador y un agente coestimulador, tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28,

20 generalmente unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas apropiadas, tales como IL-2, IL-7 y/o IL-15. Para estimular la proliferación de células CD4⁺ T o células CD8⁺ T, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besancon, Francia) pueden usarse como pueden usarse otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg y otros, *Transplant*

Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen y otros, *J. Exp. Med.* 190(9): 1319-1328, 1999; Garland y otros, *J. Immunol Meth.* 227(1 -2):53-63, 1999). Anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma perla sirven como un antígeno “sustituto” que presenta la célula (APC). En otras modalidades, las células T pueden activarse y estimularse para proliferar con células alimentadoras y anticuerpos y citocinas apropiados mediante el uso de métodos tales como los descritos en los documentos US6040177; US5827642; y WO2012129514.

En algunas modalidades, las células APC artificiales (aAPC) producidas mediante la modificación genética de las células K562, U937, 721.221, T2, y C1R para dirigir la expresión y secreción estables, de una variedad de moléculas y citocinas coestimuladoras. En una modalidad particular se usan aAPC K32 o U32 para dirigir la visualización de una o más moléculas estimuladoras basadas en anticuerpos en la superficie celular de AAPC. La expresión de varias combinaciones de genes en el aAPC permite la determinación precisa de los requisitos de activación de células T humanas, de manera que los aAPC pueden adaptarse para la propagación óptima de subconjuntos de células T con requisitos de crecimiento específicos y funciones distintas. Las aAPC respaldan el crecimiento ex vivo y la expansión a largo plazo de células T CD8 humanas funcionales sin requerir la adición de citocinas exógenas, a diferencia del uso de APC naturales. Las poblaciones de células T pueden expandirse mediante aAPC que expresan una variedad de moléculas coestimuladoras que incluyen, pero sin limitarse a, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) y/o CD80 o CD86. Finalmente, las aAPC proporcionan una plataforma eficiente para expandir células T modificadas genéticamente y mantener la expresión de CD28 en células T CD8. Las aAPC proporcionadas en los documentos WO 03/057171 y US2003/0147869 se incorporan en su totalidad por referencia..

En algunas modalidades, las células CD34⁺ se transducen con un constructo de ácido nucleico contemplado en la presente descripción. En algunas modalidades, las células CD34⁺

transducidas se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras *in vivo* después de la administración en un sujeto, generalmente el sujeto a partir del cual se aislaron originalmente las células. En algunas modalidades, las células CD34⁺ pueden estimularse *in vitro* antes de la exposición o después de modificarse genéticamente con un CAR como se describe en la presente descripción, con una o más de las siguientes citocinas: Ligando Flt-3 (FLT3), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento y diferenciación de megacariocitos (TPO), IL-3 e IL-6 de acuerdo con los métodos descritos anteriormente (Asheuer y otros, 2004; Imren, y otros, 2004). En algunas modalidades, la descripción proporciona una población de células efectoras inmunitarias modificadas para el tratamiento del cáncer, las células efectoras inmunitarias modificadas comprenden un CAR como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, se prepara una población de células efectoras inmunitarias modificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de un paciente diagnosticado con un cáncer descrito en la presente descripción (donantes autólogos). Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser CD4⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺.

Las PBMC también pueden incluir otros linfocitos citotóxicos tales como células NK o células NKT. Un vector de expresión que porta la secuencia codificante de un CAR contemplado en la presente descripción puede introducirse en una población de células T, células NK o células NKT de donantes humanos. Las células T transducidas exitosamente que portan el vector de expresión pueden clasificarse mediante el uso de citometría de flujo para aislar células T CD3 positivas y luego propagarse adicionalmente para aumentar el número de estas células T que expresan proteína CAR además de la activación celular mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 e IL-2 o cualquier otro método conocido en la técnica como se describe en otra parte de la presente descripción. Los procedimientos estándar se usan para la criopreservación de células T que expresan la proteína CAR para su

almacenamiento y/o preparación para su uso en un sujeto humano. En una modalidad, la transducción, cultivo y/o expansión in vitro de células T se realiza en ausencia de productos derivados de animales no humanos tales como suero fetal de ternera y suero fetal bovino. Dado que una población heterogénea de PBMC se modifica genéticamente, las células transducidas resultantes son una población heterogénea de células modificadas que comprenden un CAR dirigido a MUC16 como se contempla en la presente descripción.

En algunas modalidades, una mezcla de, *por ejemplo*, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más, vectores de expresión diferentes puede usarse en la modificación genética de una población donante de células efectoras inmunitarias en donde cada vector codifica una proteína receptora de antígeno quimérico diferente como se contempla en la presente descripción. Las células efectoras inmunitarias modificadas resultantes forman una población mezclada de células modificadas, con una proporción de células modificadas que expresan más de una proteína CAR diferente.

I. Métodos de fabricación de células

En algunas modalidades, la descripción proporciona métodos para fabricar células modificadas genéticamente para expresar un CAR anti-MUC16 descrito en la presente descripción. Las células fabricadas mediante los métodos contemplados en la presente descripción proporcionan composiciones de inmunoterapia adoptivas mejoradas. Sin desear unirse a ninguna teoría particular, se cree que las composiciones celulares fabricadas mediante los métodos contemplados en la presente descripción están impregnadas de propiedades superiores, que incluyen mayor supervivencia, expansión en la ausencia relativa de diferenciación, y persistencia *in vivo*.

En algunas modalidades, la descripción proporciona métodos para fabricar células T modificadas genéticamente para expresar un CAR anti-MUC16 descrito en la presente descripción. En

algunas modalidades, un método para fabricar células T comprende poner en contacto las células con uno o más agentes que modulan una vía de señalización de células PI3K. En algunas modalidades, un método para fabricar células T comprende poner en contacto las células con uno o más agentes que modulan una vía de señalización de células PI3K/Akt/mTOR. En algunas

5 modalidades, las células T pueden obtenerse de cualquier fuente y ponerse en contacto con el agente durante las fases de activación y/o expansión del proceso de fabricación. Las composiciones de células T resultantes se enriquecen en células T potentes para el desarrollo que tienen la capacidad de proliferar y expresar uno o más de los siguientes biomarcadores: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197, y CD38. En algunas modalidades, las

10 poblaciones de células que comprenden células T, que se han tratado con uno o más inhibidores de PI3K se enriquecen para una población de células T CD8+ que coexpresan uno o más o, o todos, los siguientes biomarcadores: CD62L, CD127, CD197 y CD38.

En algunas modalidades, se fabrican células T modificadas que comprenden niveles mantenidos de proliferación y disminución de la diferenciación. En algunas modalidades, las células T se

15 fabrican estimulando a las células T para que se activen y proliferen en presencia de una o más señales estimuladoras y un agente que es un inhibidor de una vía de señalización de células PI3K.

Para lograr suficientes dosis terapéuticas de composiciones de células T, las células T frecuentemente se someten a una o más rondas de estimulación, activación y/o expansión. Las

20 células T pueden activarse y expandirse generalmente mediante el uso de métodos como se describió, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; y 6,867,041, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad.

- Las células T pueden modificarse entonces para expresar un CAR anti-MUC16. En algunas modalidades, las células T se modifican transduciendo las células T con un vector viral que comprende un CAR anti-MUC16 contemplado en la presente descripción. En algunas modalidades, las células T se modifican antes de la estimulación y activación en presencia de un
- 5 inhibidor de una vía de señalización de células PI3K. En algunas modalidades, las células T se modifican después de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización de células PI3K. En algunas modalidades, las células T se modifican dentro de 12 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas de estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización de células PI3K.
- 10 Después de activar las células T, las células se cultivan para proliferar. Las células T pueden cultivarse durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o más con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más rondas de expansión.
- En algunas modalidades, las composiciones de células T se fabrican en presencia de uno o más inhibidores de la vía PI3K. Los inhibidores pueden dirigirse a una o más actividades en la vía o a
- 15 una sola actividad. Sin desear unirse a ninguna teoría particular, se contempla que el tratamiento o el contacto de las células T con uno o más inhibidores de la vía PI3K durante las fases de estimulación, activación y/o expansión del proceso de fabricación aumenta preferentemente las células T jóvenes, lo que produce de esta manera composiciones de células T terapéuticas superiores.
- 20 En algunas modalidades, se proporciona un método para aumentar la proliferación de células T que expresan un receptor de células T modificado genéticamente. Tales métodos pueden comprender, por ejemplo, recolectar una fuente de células T de un sujeto, estimular y activar las células T en presencia de uno o más inhibidores de la vía PI3K, modificación de las células T para expresar un CAR anti-MUC16 y expandir las células T en cultivo.

En algunas modalidades, las células T modificadas genéticamente se expanden mediante el contacto con un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3 TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T.

En algunas modalidades, las PBMC o las células T aisladas se ponen en contacto con un agente estimulador y un agente coestimulador, como anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28, o anticuerpos unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citoquinas apropiadas, como IL-2, IL-7, y/o IL-15.

En algunas modalidades, las PBMC o las células T aisladas se ponen en contacto con un agente estimulador y un agente coestimulador, como anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28, o anticuerpos unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citoquinas apropiadas, como inhibidor de IL-2, IL-7, y/o IL-15 y/o a PI3K.

En algunas modalidades, un método para producir poblaciones de células T enriquecidas para la expresión de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197, y CD38. En algunas modalidades, las células T jóvenes comprenden uno o más de, o todos los siguientes marcadores biológicos: CD62L, CD127, CD197 y CD38. En una modalidad, las células T jóvenes carecen de expresión de CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3.

En algunas modalidades, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se usan como fuente de células T en los métodos de fabricación de células T contemplados en la presente descripción. Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser CD4⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺ y pueden incluir otras células mononucleares tales como monocitos, células B, células NK y células NKT. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un TCR o CAR modificado genéticamente contemplado en la presente descripción puede introducirse en una población de células T, células NK o células NKT de donantes humanos. Las

células T transducidas exitosamente que portan el vector de expresión pueden clasificarse mediante el uso de citometría de flujo para aislar células T CD3 positivas y luego propagarse adicionalmente para aumentar el número de células T modificadas además de la activación celular mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 e IL-2, IL-7 y/o IL-15 o cualquier otro método conocido en la técnica como se describe en otra parte en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, el término “inhibidor de PI3K” se refiere a un ácido nucleico, péptido, compuesto, o molécula orgánica pequeña que se une a e inhibe al menos una actividad de PI3K. Las proteínas PI3K pueden dividirse en tres clases, PI3Ks clase 1, PI3Ks clase 2 y PI3Ks clase 3. Las PI3Ks clase 1 existen como heterodímeros que consisten en una de cuatro subunidades catalíticas p110 (p110 α , p110 β , p110 δ y p110 γ) y una de dos familias de subunidades reguladoras. Un inhibidor de PI3K se dirige preferentemente a los inhibidores de PI3K de clase 1. En una modalidad, un inhibidor de PI3K mostrará selectividad para una o más isoformas de los inhibidores de PI3K de clase 1 (*es decir*, selectividad para p110 α , p110 β , p110 δ y p110 γ o uno o más de p110 α , p110 β , p110 δ y p110 γ). En otro aspecto, un inhibidor de PI3K no mostrará selectividad de isoforma y se considerará un “inhibidor de la pan-PI3K”. En una modalidad, un inhibidor de PI3K competirá por la unión con ATP al dominio catalítico de PI3K.

En algunas modalidades, un inhibidor de PI3K puede, por ejemplo, dirigirse a PI3K así como a proteínas adicionales en la vía PI3K-AKT-mTOR. En algunas modalidades, un inhibidor de PI3K que se dirige tanto a mTOR como a PI3K puede denominarse inhibidor de mTOR o inhibidor de PI3K. Un inhibidor de PI3K que solo se dirige a PI3K puede denominarse inhibidor selectivo de PI3K. En algunas modalidades, puede entenderse que un inhibidor selectivo de PI3K se refiere a un agente que exhibe una concentración inhibidora del 50 % con respecto a PI3K que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al

menos 1000 veces o más, menor que la IC₅₀ del inhibidor con respecto a mTOR y/u otras proteínas en la trayectoria.

En algunas modalidades, los inhibidores de PI3K ilustrativos inhiben PI3K con una IC₅₀ (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos,

5 preferentemente aproximadamente 100 nm o menos, incluso con mayor preferencia aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 1 µM o menos.

En una modalidad, un inhibidor de PI3K inhibe PI3K con una IC₅₀ de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, con mayor preferencia de aproximadamente 2 nM a aproximadamente

10 50 nM, incluso con mayor preferencia de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.

Los ejemplos ilustrativos de inhibidores de PI3K adecuados para su uso en los métodos de fabricación de células T contemplados en modalidades particulares incluyen, pero no se limitan a, BKM120 (inhibidor de PI3K de clase 1, Novartis), XL147 (inhibidor de PI3K de clase 1, Exelixis), (inhibidor de pan-PI3K, GlaxoSmithKline) y PX-866 (inhibidor de PI3K de clase 1; p110α, p110β
15 y isoformas p110γ, Oncothyreon).

Otros ejemplos ilustrativos de inhibidores selectivos de PI3K incluyen, pero no se limitan a, BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101, ZSTK474 e IPI-145. Otros ejemplos ilustrativos de inhibidores de pan-PI3K incluyen, pero no se limitan a, BEZ235, LY294002, GSK1059615, TG100713 y GDC-0941. Algunas modalidades, el inhibidor de PI3K es ZSTK474.

20 En algunas modalidades, se proporciona un método para aumentar la proliferación de células T que expresan un receptor de células T modificado genéticamente. Tales métodos pueden comprender, por ejemplo, recolectar una fuente de células T de un sujeto, estimular y activar las células T, modificar las células T para expresar un CAR y expandir las células T en cultivo en donde las células T se fabrican en presencia de uno o más inhibidores de PI3K en cualquiera de

las más etapas del proceso de fabricación.

Los métodos de fabricación contemplados en la presente descripción pueden comprender además la crioconservación de células T modificadas para su almacenamiento y/o preparación para su uso en un sujeto humano. Las células T se crioconservan de manera que las células permanecen viables tras la descongelación. Cuando sea necesario, las células efectoras inmunitarias transformadas crioconservadas pueden descongelarse, cultivarse y expandirse para más células de este tipo. Como se usa en la presente descripción, “criopreservación”, se refiere a la conservación de células mediante enfriamiento a temperaturas por debajo de cero, tal como (típicamente) 77 K o -196 °C (el punto de ebullición de nitrógeno líquido). Los agentes crioprotectores se usan a menudo a temperaturas inferiores a cero para evitar que las células se conserven de daños debido a la congelación a bajas temperaturas o al calentamiento a temperatura ambiente. Los agentes criopreservantes y las tasas de enfriamiento óptimas pueden proteger contra lesiones celulares. Los agentes crioprotectores que pueden usarse incluyen pero no se limitan a dimetilsulfóxido (DMSO) (Lovelock y Bishop, *Nature*, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature*, 1961; 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960; 85: 576) y polietilenglicol (Sloviter y Ravdin, *Nature*, 1962; 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es de 1 °C a 3 °C/minuto. Después de al menos dos horas, las células T han alcanzado una temperatura de -80 °C y pueden colocarse directamente en nitrógeno líquido (-196 °C) para su almacenamiento permanente tal como en un recipiente de almacenamiento criogénico a largo plazo.

J. Composiciones y formulaciones

En algunas modalidades, la divulgación proporciona composiciones que comprenden uno o más polipéptidos, polinucleótidos, vectores que comprenden los mismos, células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente, etc., según se contempla en la presente descripción.

Las composiciones incluyen, pero sin limitarse a, composiciones farmacéuticas. Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición formulada en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para la administración a una célula o un animal, ya sea sola o en combinación con una o más modalidades de terapia. También se

5 entenderá que, si se desea, las composiciones de la divulgación también pueden administrarse en combinación con otros agentes, tales como, por ejemplo, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas, quimioterapéuticos, profármacos, fármacos, anticuerpos u otros diversos agentes farmacéuticamente activos. Prácticamente no hay límite a otros componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre y cuando los agentes adicionales
10 no afecten negativamente la capacidad de la composición para suministrar la terapia prevista.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente descripción para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o
15 proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en la presente descripción, "portador, diluyente o excipiente farmacéutica o fisiológicamente aceptable" incluye sin limitación cualquier adyuvante, portador, excipiente, deslizante, agente edulcorante, diluyente, conservante, colorante/colorante, potenciador del sabor, surfactante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizador,
20 agente isotónico, solvente, surfactante o emulsionante que ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos como aceptable para su uso en humanos o animales domésticos. Los portadores farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, a los azúcares, como la lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tal como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa, y sus derivados, tal como

- carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto; malta; gelatina; talco; manteca de cacao, ceras, grasas animales y vegetales, parafinas, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de zinc; aceites, como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tal como propilenglicol; polioles, como la glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tal como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes amortiguadores, tal como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; La solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones amortiguadoras de fosfato; y cualquier otra sustancia compatible empleada en formulaciones farmacéuticas.
- 10 En algunas modalidades, una composición comprende una cantidad de células efectoras inmunitarias que expresan CAR contempladas en la presente descripción. Tal como se utiliza en la presente descripción, el término “cantidad” se refiere a “una cantidad eficaz” o “una cantidad eficaz” de una célula terapéutica modificada genéticamente, por ejemplo, una célula T, para lograr un resultado profiláctico o terapéutico beneficioso o deseado, incluidos los resultados clínicos.
- 15 Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad de una célula terapéutica modificada genéticamente eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva es menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.
- 20 Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una célula terapéutica modificada genéticamente puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de las células madre y progenitoras para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad con eficacia terapéutica es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del virus o células terapéuticas transducidas se ve

superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” incluye una cantidad que es eficaz para “tratar” a un sujeto (*por ejemplo*, un paciente).

Cuando se indica una cantidad terapéutica, la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención que se administrarán puede determinarse por un médico teniendo en cuenta

5 las diferencias individuales entre edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y afección del paciente (sujeto).

Generalmente puede indicarse que una composición farmacéutica que comprende las células T

descritas en la presente descripción puede administrarse a una dosificación de 10^2 a 10^{10} células/kg de peso corporal, preferentemente de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, que

10 incluye todos los valores enteros dentro de esos intervalos. El número de células dependerá del uso final para el que se destina la composición al igual que el tipo de células incluidas en la misma. Para los usos proporcionados en la presente descripción, las células están generalmente en un volumen de un litro o menos, pueden ser de 500 mL o menos, incluso 250 mL o 100 mL o menos. Por lo tanto, la densidad de las células deseadas es típicamente mayor que 10^6

15 células/mL y generalmente es mayor que 10^7 células/mL, generalmente 10^8 células/mL o mayor.

El número clínicamente relevante de células inmunitarias puede dividirse en múltiples infusiones que de manera acumulativa sean iguales o superen 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o 10^{12}

células. En algunos aspectos de la presente invención, en particular dado que todas las células infundidas se redirigirán a un antígeno diana concreto (*por ejemplo*, cadena ligera κ o λ), puede

20 administrarse un número inferior de células, del orden de 10^6 /kilogramo (10^6 - 10^{11} por paciente).

Las composiciones celulares que expresan CAR pueden administrarse múltiples veces a dosificaciones dentro de estos intervalos. Las células pueden ser alogénicas, singénicas, xenogénicas o autólogas al paciente que se somete a terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (*por ejemplo*, PHA) o linfocinas, citocinas y/o

quimiocinas (por ejemplo, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α , IL-18 y TNF- β , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , etc.) como se describe en la presente descripción para potenciar la inducción de la respuesta inmunitaria.

Generalmente, las composiciones que comprenden las células activadas y expandidas como se describe en la presente descripción pueden utilizarse en el tratamiento y prevención de enfermedades que surgen en personas que están inmunodeprimidas. En particular, las composiciones que comprenden las células T modificadas con CAR contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de cánceres que expresan MUC16. Las células T modificadas con CAR de la presente invención pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con portadores, diluyentes, excipientes y/o con otros componentes como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente descripción comprenden una cantidad de células T modificadas genéticamente, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden una población de células efectoras inmunitarias que expresan CAR, tales como células T, pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (*por ejemplo*, hidróxido de aluminio); y conservantes. En algunas modalidades, las composiciones se formulan para administración parenteral, por ejemplo, administración intravascular (intravenosa o intraarterial), intraperitoneal o intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, si son soluciones, suspensiones u otra forma similar, puede incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles como agua para inyección, solución

salina, preferentemente solución salina fisiológica, La solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como solvente o medio de suspensión, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otros solventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

- 10 En algunas modalidades, las composiciones de células T aquí contempladas se formulan en un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones son adecuadas para la administración a sujetos humanos. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable es un medio libre de suero.

El medio libre de suero tiene varias ventajas sobre el medio que contiene suero, que incluye una
15 composición simplificada y mejor definida, un grado reducido de contaminantes, la eliminación de una fuente potencial de agentes infecciosos y un menor costo. En algunas modalidades, el medio libre de suero está libre de animales y opcionalmente puede estar libre de proteínas. Opcionalmente, el medio puede contener proteínas recombinantes biofarmacéuticamente aceptables. El medio "libre de animales" se refiere al medio en donde los componentes se derivan
20 de fuentes no animales. Las proteínas recombinantes reemplazan a las proteínas animales nativas en medio libre de animales y los nutrientes se obtienen de fuentes sintéticas, vegetales o microbianas. El medio "libre de proteínas", por el contrario, se define como sustancialmente libre de proteínas.

Los ejemplos ilustrativos de medios libres de suero usados en composiciones particulares

incluyen, pero sin limitarse a, QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), StemPro-34 (Life Technologies) y X-VIVO 10.

En algunas modalidades, las composiciones que comprenden células efectoras inmunitarias contempladas en la presente descripción se formulan en una solución que comprende

5 PlasmaLyte A.

En algunas modalidades, las composiciones que comprenden células efectoras inmunitarias contempladas en la presente descripción se formulan en una solución que comprende un medio de criopreservación. Por ejemplo, los medios de criopreservación con agentes de criopreservación pueden usarse para mantener un resultado de alta viabilidad celular después

10 de la descongelación. Los ejemplos ilustrativos de medios de criopreservación usados en composiciones particulares incluyen, pero sin limitarse a, CryoStor CS10, CryoStor CS5 y CryoStor CS2.

En algunas modalidades, las composiciones que comprenden células efectoras inmunitarias contempladas en la presente descripción se formulan en una solución que comprende

15 PlasmaLyte A 50:50 al CryoStor CS10.

K. Kits

En algunas modalidades, la descripción proporciona un kit que comprende una población de células efectoras inmunitarias que expresan un CAR anti-MUC16, o una composición farmacéutica de este. En algunas modalidades, el kit comprende instrucciones para administrar

20 la población de células efectoras inmunitarias o su composición farmacéutica a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el sujeto que lo necesita tiene células cancerosas que expresan MUC16.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un kit que comprende una población de células efectoras inmunitarias que expresan un CAR anti-MUC16, o una composición

farmacéutica de este, e instrucciones para administrar las células o composición a un sujeto que lo necesita que ha recibido o recibido un inhibidor del punto de control inmunitario. En algunas modalidades, la descripción proporciona un kit que comprende una población de células efectoras inmunitarias que expresan un CAR anti-MUC16, o una composición farmacéutica de este, e

5 instrucciones para administrar las células o composición a un sujeto que lo necesita que ha recibido o recibido nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, o cemiplimab.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un kit que comprende una población de células efectoras inmunitarias que expresan un CAR anti-MUC16, o una composición farmacéutica de este, e instrucciones para administrar las células o composición a un sujeto que

10 lo necesita que ha recibido o recibido un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión específico para un antígeno asociado a un tumor y un segundo dominio de unión específico para CD3. En algunas modalidades, la descripción proporciona un kit que comprende una población de células efectoras inmunitarias que expresan un CAR anti-MUC16, o una composición farmacéutica de este, e instrucciones para administrar las células o

15 composición a un sujeto que lo necesita que ha recibido o recibido un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión específico para un antígeno asociado a un tumor y un segundo dominio de unión específico para CD28.

L. Métodos terapéuticos

Las células inmunitarias efectoras modificadas genéticamente que expresan un CAR

20 contempladas en la presente descripción proporcionan métodos mejorados de inmunoterapia adoptiva para su uso en la prevención, tratamiento y mejora de un cáncer, o para prevenir, tratar o mejorar al menos un síntoma asociado a un cáncer.

En algunas modalidades, las células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente contempladas en la presente descripción proporcionan métodos mejorados de inmunoterapia

adoptiva para su uso en el aumento de la citotoxicidad en células cancerosas en un sujeto o para su uso en la disminución del número de células cancerosas en un sujeto.

En algunas modalidades, la especificidad de una célula efectora inmunitaria primaria se redirige a células que expresan un antígeno particular, *por ejemplo*, MUC16, mediante la modificación genética de la célula efectora inmunitaria primaria con un CAR anti-MUC16 como se contempla en la presente descripción. En algunas modalidades, se usa un vector viral para modificar genéticamente una célula efectora inmunitaria con un polinucleótido particular que codifica un CAR anti-MUC16.

En algunas modalidades, se proporciona un tipo de terapia celular donde las células T se modifican genéticamente para expresar un CAR anti-MUC16 dirigido a células cancerosas que expresan MUC16, y las células T se infunden a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de matar enfermedades que causan células en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las terapias con células T son capaces de replicarse *in vivo*, lo que da como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a un tratamiento oncológico sostenido.

En algunas modalidades, las células T que expresan un CAR anti-MUC16 experimentan una expansión sólida de células T *in vivo* y pueden persistir durante una cantidad de tiempo prolongada. En algunas modalidades, las células T que expresan un CAR anti-MUC16 evolucionan hacia células T de memoria específicas o células T de memoria de células madre que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación o crecimiento tumoral adicional.

En modalidades particulares se contemplan ejemplos ilustrativos de afecciones que pueden tratarse, prevenirse o mejorarse mediante el uso de las células efectoras inmunitarias que expresan un CAR anti-MUC16. En algunas modalidades, la descripción proporciona métodos para tratar un cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesita células efectoras

inmunitarias que expresan CAR anti-MUC16 o una composición que comprende las mismas. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de: cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma, tipo formador de la masa del colangiocarcinoma intrahepático, adenocarcinoma del útero y adenocarcinoma del tracto gástrico.

En algunas modalidades, se proporcionan métodos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células efectoras inmunitarias que expresan un CAR anti-MUC16 o una composición que comprende el mismo, a un paciente que lo necesita, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. En algunas modalidades, las células se usan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar una afección asociada con células cancerosas. Por lo tanto, en modalidades particulares, métodos para el tratamiento o prevención o mejora de al menos un síntoma de cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T modificadas que expresan un CAR anti-MUC16.

Las células inmunitarias efectoras modificadas genéticamente que expresan un CAR contempladas en el presente documento proporcionan métodos mejorados de inmunoterapia adoptiva para su uso en la prevención, tratamiento y mejora de un cáncer, o para prevenir, tratar o mejorar al menos un síntoma asociado a un cáncer. En algunas modalidades, un sujeto incluye cualquier animal que muestra síntomas de una enfermedad, trastorno, o afección relacionada con el cáncer que puede tratarse con los vectores de terapia génica, agentes terapéuticos basados en células, y métodos contemplados en otra parte de la presente descripción. Los sujetos adecuados (*por ejemplo*, pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja, y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos. Los sujetos

típicos son los pacientes humanos que padecen un cáncer, a los que se les ha diagnosticado un cáncer o que corren el riesgo de padecerlo.

Como se usa en la presente descripción, el término “paciente” se refiere a un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad, trastorno, o afección particular que puede tratarse con los
5 vectores de terapia génica, agentes terapéuticos basados en células, y métodos descritos en otra parte de la presente descripción.

Como se usa en la presente “tratamiento” o “que trata”, incluye cualquier efecto beneficioso o conveniente sobre los síntomas o patología de una enfermedad o afección patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o
10 afección que se trata. El tratamiento puede implicar opcionalmente ya sea la reducción de la enfermedad o afección, o el retraso de la progresión de la enfermedad o afección. El “tratamiento” no indica necesariamente la erradicación completa o la cura de la enfermedad o afección, o los síntomas asociados de esta.

Como se usa en la presente, “prevenir”, y palabras similares tales como “prevenido”,
15 “prevención”, etc., indican un enfoque para prevenir, inhibir o reducir la posibilidad de la ocurrencia o recurrencia de una enfermedad o afección. También se refiere a retrasar la aparición o recurrencia de una enfermedad o afección o retrasar la aparición o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o afección. Como se usa en la presente, “prevención” y palabras similares también incluyen reducir la intensidad, efecto, síntomas y/o carga de una enfermedad o afección
20 antes del inicio o recurrencia de la enfermedad o afección.

Como se utiliza en la presente descripción, la frase “mejorar al menos un síntoma de” se refiere a la disminución de uno o más síntomas de la enfermedad o condición para la que el sujeto está siendo tratado. En algunas modalidades, la enfermedad o afección que se trata es un cáncer, en donde el uno o más síntomas mejorados incluyen, pero sin limitarse a, debilidad, fatiga, disnea,

hematomas y hemorragias fáciles, infecciones frecuentes, agrandamiento de los nodos linfáticos, abdomen distendido o doloroso (debido a órganos abdominales dilatados), dolor óseo o articular, fracturas, pérdida de peso no planificada, poco apetito, sudoraciones nocturnas, fiebre leve persistente y disminución de la micción (debido a una función renal deficiente).

- 5 Por "mejorar" o "promover", o "aumentar" o "expandir" se entiende en general la capacidad de una composición contemplada en el presente documento, por ejemplo, unas células T modificadas genéticamente que expresan un CAR anti-MUC16, para producir, provocar o causar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos descendentes) en comparación con la respuesta causada por un vehículo o una molécula/composición de control. Una respuesta
- 10 fisiológica medible puede incluir un aumento en la expansión de células T, activación, persistencia, y/o un aumento en la capacidad de destrucción de células cancerosas, entre otras evidentes a partir de la comprensión en la técnica y la descripción en la presente descripción. Una cantidad "aumentada" o "potenciada" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30
- 15 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluidos todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) la respuesta producida por el vehículo o una composición de control.

- Por "disminución" o "inferior", o "menos", o "reducir", o "anular" se refiere generalmente a la capacidad de la composición contemplada en la presente descripción para producir, provocar o
- 20 causar una respuesta fisiológica menor (es decir, efectos aguas abajo) en comparación con la respuesta causada por el vehículo o una molécula/composición de control. Una "disminución" o cantidad "reducida" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución que es 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluidos todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de

1, por ejemplo, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) la respuesta (respuesta de referencia) producida por el vehículo, una composición de control o la respuesta en un linaje celular particular.

Por "mantenimiento", o "preservación", o "mantenimiento", o "sin cambio", o "sin cambio sustancial", o "sin disminución sustancial" se refiere generalmente a la capacidad de una

5 composición contemplada en la presente descripción para producir, provocar o causar una respuesta fisiológica similar (es decir, efectos aguas abajo) en una célula, en comparación con la respuesta causada por cualquiera de los vehículos, una molécula/composición de control, o la respuesta en un linaje celular particular. Una respuesta comparable es una que no es significativamente diferente o medible diferente de la respuesta de referencia.

10 En algunas modalidades, un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita comprende administrar una cantidad eficaz, *por ejemplo*, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente contempladas en la presente descripción. La cantidad y la frecuencia de administración se determinarán por factores tales como la afección del paciente, y el tipo y la gravedad de la

15 enfermedad del paciente, aunque los ensayos clínicos pueden determinar las dosificaciones adecuadas.

En algunas modalidades, la cantidad de células efectoras inmunitarias, *p. ej.*, células T que expresan un CAR anti-MUC16, en la composición administrada a un sujeto es al menos 0.1×10^5 células, al menos 0.5×10^5 células, al menos 1×10^5 células, al menos 5×10^5 células, al menos

20 1×10^6 células, al menos 0.5×10^7 células, al menos 1×10^7 células, al menos 0.5×10^8 células, al menos 1×10^8 células, al menos 0.5×10^9 células, al menos 1×10^9 células, al menos 2×10^9 células, al menos 3×10^9 células, al menos 4×10^9 células, al menos 5×10^9 células, o al menos 1×10^{10} células.

En algunas modalidades, aproximadamente 1×10^7 células T a aproximadamente 1×10^9 células

T, aproximadamente 2×10^7 células T a aproximadamente 0.9×10^9 células T, aproximadamente 3×10^7 células T a aproximadamente 0.8×10^9 células T, aproximadamente 4×10^7 células T a aproximadamente 0.7×10^9 células T, aproximadamente 5×10^7 células T a aproximadamente 0.6×10^9 células T, o aproximadamente 5×10^7 células T a aproximadamente 0.5×10^9 células T

5 se administran a un sujeto.

En algunas modalidades, la cantidad de células efectoras inmunitarias, *p. ej.*, Células T que expresan un CAR anti-MUC16, en la composición administrada a un sujeto es al menos 0.1×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 0.5×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^5 células/kg de peso corporal, al menos 0.5×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 0.5×10^7 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^7 células/kg de peso corporal, al menos 0.5×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 2×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 3×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 4×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^8 células/kg de peso corporal, o al menos 1×10^9 células/kg de peso corporal.

En algunas modalidades, aproximadamente 1×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente 1×10^8 células T/kg de peso corporal, aproximadamente 2×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente 0.9×10^8 células T/kg de peso corporal, aproximadamente 3×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente 0.8×10^8 células T/kg de peso corporal, aproximadamente 4×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente 0.7×10^8 células T/kg de peso corporal, aproximadamente 5×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente 0.6×10^8 células T/kg de peso corporal, o aproximadamente 5×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente 0.5×10^8 células T/kg de peso corporal se administran a un sujeto.

Un experto en la materia reconocería que pueden ser necesarias múltiples administraciones de las composiciones contempladas en el presente documento para lograr el tratamiento deseado. Por ejemplo, una composición puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces durante un intervalo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

En algunas modalidades, puede ser deseable administrar células inmunitarias efectoras activadas a un sujeto y posteriormente volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar células inmunitarias efectoras de la misma y reinfundir al paciente con estas células inmunitarias efectoras activadas y expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En algunas modalidades, las células efectoras inmunitarias pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. Algunas modalidades, las células efectoras inmunitarias se activan a partir de extracciones de sangre de 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, 100cc, 150cc, 200cc, 250cc, 300cc, 350cc, o 400cc o más. No debe limitarse a la teoría, el uso de este protocolo de extracción de sangre múltiple/reinfusión múltiple puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de células inmunitarias efectoras.

La administración de las composiciones contempladas en la presente descripción puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluso mediante inhalación, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante de aerosol. En algunas modalidades, las composiciones se administran por vía parenteral. Las frases “administración parenteral” y “administrada parenteralmente” como se usan en la presente descripción se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, ϕ , por vía intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intratumoral, intracardíaco, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutáneo, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoide, inyección e infusión intraespinal e intraesternal. En

algunas modalidades, las composiciones contempladas en la presente descripción se administran a un sujeto mediante inyección directa en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

En algunas modalidades, a un sujeto que lo necesita se le administra una cantidad eficaz de una composición para aumentar una respuesta inmunitaria celular a una célula o tumor MUC16-

5 expressing en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas por células T citotóxicas capaces de matar células infectadas, células T reguladoras y respuestas de células T auxiliares. También pueden inducirse respuestas inmunitarias humorales, mediadas principalmente por células T auxiliares capaces de activar células B, lo que conduce a la producción de anticuerpos. Pueden usarse una variedad de técnicas para analizar
10 el tipo de respuestas inmunitarias inducidas por las composiciones, que se describen bien en la técnica; *por ejemplo*, Current Protocols in Immunology, editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar a un sujeto diagnosticado con
15 cáncer que comprende eliminar células efectoras inmunitarias del sujeto, modificar genéticamente dichas células efectoras inmunitarias con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR anti-MUC16, producir de esta manera una población de células efectoras inmunitarias modificadas y administrar la población de células efectoras inmunitarias modificadas al mismo sujeto. En algunas modalidades, las células efectoras inmunitarias
20 comprenden células T.

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para estimular una respuesta moduladora inmunitaria mediada por células efectoras inmunitarias a una población de células diana en un sujeto que comprenden las etapas de administrar al sujeto una población de células efectoras inmunitarias que expresa un constructo de ácido nucleico que codifica un CAR anti-MUC16.

Los métodos para administrar las composiciones celulares contempladas en modalidades particulares incluyen cualquier método que sea eficaz para dar lugar a la reintroducción de células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente *ex vivo* que expresen directamente un CAR anti-MUC16 en el sujeto o en la reintroducción de los progenitores de células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente que al introducirse en un sujeto se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras que expresan el CAR. Un método comprende transducir células T de sangre periférica *ex vivo* con un constructo de ácido nucleico contemplado en la presente descripción y devolver las células transducidas al sujeto.

1. Tratamiento combinado

- En algunas modalidades, las composiciones contempladas en la presente descripción comprenden una cantidad eficaz de células efectoras inmunitarias que expresan CAR, en terapia combinada, *por ejemplo*, con uno o más agentes terapéuticos. Como se usa en la presente descripción, "terapia combinada" abarca la administración de cada agente o terapia de una manera secuencial en un régimen que proporcionará efectos beneficiosos de la combinación, y la administración conjunta de estos agentes o terapias de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una única cápsula que tiene una relación fija de estos agentes activos o en múltiples cápsulas separadas para cada agente. La terapia combinada también incluye combinaciones donde los elementos individuales pueden administrarse en diferentes momentos y/o por diferentes vías pero que actúan en combinación para proporcionar un efecto beneficioso por coacción o efecto farmacocinético y farmacodinámico de cada agente o enfoques de tratamiento tumoral de la terapia combinada.

Por lo tanto, las composiciones de células efectoras inmunitarias que expresan CAR pueden administrarse en combinación con otros tratamientos contra el cáncer conocidos, tales como terapia de radiación, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia

fotodinámica, *etc.* Las composiciones también pueden administrarse en combinación con antibióticos. Tales agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para un estado de enfermedad particular como se describe en la presente descripción, tal como un cáncer particular. Los agentes terapéuticos ilustrativos contemplados incluyen

5 citocinas, factores de crecimiento, esteroides, NSAID, DMARD, antiinflamatorios, quimioterapéuticos, radioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos, virus oncolíticos, u otros agentes activos y auxiliares.

En algunas modalidades, las composiciones que comprenden células efectoras inmunitarias que expresan CAR divulgadas en la presente descripción pueden administrarse junto con cualquier

10 número de agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos ilustrativos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquena, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosfo-ramida, trietilentiofosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas

15 de nitrógeno tales como clorambucilo, cloronafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como alacinomicinas, actinomicina, au-tramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina,

20 caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinamicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-díazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, mar-celomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como

metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterin, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU;

5 andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; el- formitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano;

10 lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazonico; triazicuona; 2, 2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamidamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb

15 Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000;

20 difluorometilomitina (DMFO); derivados del ácido retinoico tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileucina difitox); esperamicinas; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre cánceres tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno,

raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

- 5 Una variedad de otros agentes terapéuticos puede usarse junto con las composiciones descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, la composición que comprende células efectoras inmunitarias que expresan CAR se administra con un agente antiinflamatorio. Los agentes o fármacos antiinflamatorios incluyen, pero sin limitarse a, esteroides y glucocorticoides (que incluyen betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, 10 hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS) que incluyen aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato.

- Otros NSAID ilustrativos se eligen del grupo que consiste en ibuprofeno, naproxeno, naproxeno 15 sódico, inhibidores de Cox-2 tales como VIOXX® (rofecoxib) y CELEBREX® (celecoxib) y sialilatos. Los analgésicos ilustrativos se eligen del grupo que consiste en acetaminofén, oxicodona, tramadol de clorhidrato de propoxifeno. Los glucocorticoides ilustrativos se eligen del grupo que consiste en cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona o prednisona. Los modificadores de la respuesta biológica ilustrativos incluyen moléculas 20 dirigidas contra marcadores de la superficie celular (por ejemplo, CD4, CD5, etc.), inhibidores de citocinas, tales como los antagonistas de TNF (por ejemplo, etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) e infliximab (REMICADE®), inhibidores de quimiocinas e inhibidores de moléculas de adhesión. Los modificadores de la respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales así como también formas recombinantes de moléculas. Los DMARD ilustrativos

incluyen azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, Gold (oral (auranofina) e intramuscular) y minociclina.

Ejemplos ilustrativos de anticuerpos terapéuticos adecuados para la combinación con las células T modificadas con CAR contemplados en la presente descripción, incluyen, pero sin limitarse a,

5 bavituximab, bevacizumab (avastina), bivatuzumab, blinatumomab, conatumumab, daratumumab, duligotumab, dacetuzumab, dalotuzumab, elotuzumab (HuLuc63), gemtuzumab, ibritumomab, indatuximab, inotuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, milatuzumab, moxetumomab, ocaratuzumab, ofatumumab, rituximab, siltuximab, teprotumumab y ublituximab.

En algunas modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción se administran

10 junto con una citocina. Por "citocina" como se usa en la presente se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas del crecimiento tales como la hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano con N-metionilo, y hormona del crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como la hormona estimulante de folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora muleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; 20 activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-

CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1alpha, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, IL-21, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando del kit (KL). En una modalidad, el término citocina incluye citocinas

5 “enmascaradas”, que incluyen, pero no se limitan a, IL-2 enmascarada. Como se usa en la presente, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante, y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativas.

En algunas modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción se administran en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario.

10 Como se usa en la presente descripción, "punto de control inmunitario" se refiere a señales coestimuladoras e inhibidoras que regulan la amplitud y calidad del reconocimiento de un antígeno por parte del receptor de células T. En algunas modalidades, el punto de control inmunitario es una señal inhibidora. En algunas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre PD-1 y PD-L1. En algunas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre CTLA-4

15 y CD80 o CD86 para desplazar la unión a CD28. En algunas modalidades la señal inhibidora es la interacción entre las moléculas LAG3 y MHC de clase II. En algunas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre TIM3 y la galectina 9. En algunas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre OX40 y OX40L.

Las funciones efectoras y de activación de las células T se equilibran mediante señales

20 coestimuladoras e inhibidoras, denominadas “puntos de control inmunitarios”. Los ligandos y receptores inhibidores que regulan las funciones efectoras de las células T se sobreexpresan en las células tumorales. Posteriormente, los agonistas de los receptores coestimuladores o antagonistas de señales inhibidoras, dan como resultado la amplificación de las respuestas de células T específicas de antígeno. A diferencia de los anticuerpos terapéuticos dirigidos

directamente a las células tumorales, el inhibidor del punto de control inmunitario mejora la actividad antitumoral endógena. En ciertas modalidades, un inhibidor de puntos de control inmunitario adecuado para su uso en los métodos descritos en la presente descripción, es un antagonista de las señales inhibitoras, *por ejemplo*, un anticuerpo que se dirige, *por ejemplo*, a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, B7-H3, B7-H4 o TIM3. Estos ligandos y receptores se revisan en Pardoll, D., Nature. 12: 252-264, 2012. En algunas modalidades, un inhibidor del punto de control inmunitario se dirige a una molécula seleccionada del grupo que consiste en: PD-1, PD-L1, PD-L2, CLTA4, GITR, ICOS, ICOSL, B7H3, B7H4, TIM3, LAG3, OX40, CD27, CD70, CD47 y CD137. Como se usa en la presente descripción, "inhibidor del punto de control inmunitario" se refiere a una molécula que reduce, inhibe, interfiere o modula total o parcialmente una o más proteínas del punto de control. En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario evita las señales inhibitoras asociadas con el punto de control inmunitario. En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, o fragmento de este, que interrumpe la señalización inhibitora asociada con el punto de control inmunitario. En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es una molécula pequeña que interrumpe la señalización inhibitora. En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, fragmento de este, o simulación de anticuerpo, que evita la interacción entre proteínas bloqueantes del punto de control, *por ejemplo*, un anticuerpo, o fragmento de este, que evita la interacción entre PD-1 y PD-L1. En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, o fragmento de este, que evita la interacción entre CTLA-4 y CD80 o CD86. En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, o fragmento de este, que evita la interacción entre LAG3 y sus ligandos, o TIM-3 y sus ligandos. En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, o fragmento de este, que evita la interacción entre OX40 y sus ligandos. El bloqueador del punto

de control también puede tener la forma de la forma soluble de las moléculas (o variantes de estas) en sí mismas, *por ejemplo*, una fusión de PD-L1 o PD-L1 soluble.

En la presente descripción se describen métodos para tratar a un sujeto afectado por enfermedades tales como el cáncer, cuyos métodos comprenden administrar al sujeto una población de células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente para expresar un CAR anti-MUC16 y un inhibidor del punto de control inmunitario. En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de este, que interrumpe o inhibe la señalización de un inmunorregulador inhibidor. En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es una molécula pequeña que interrumpe o inhibe la señalización de un inmunorregulador inhibidor.

En algunas modalidades, el inmunorregulador inhibidor (inhibidor del punto de control inmunitario) es un componente de la vía de señalización de PD-1/PD-L1. En consecuencia, ciertas modalidades de la descripción proporcionan métodos para la inmunoterapia de un sujeto afectado por cáncer, cuyos métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de este que interrumpe la interacción entre el receptor de PD-1 y su ligando, PD-L1. Los anticuerpos conocidos en la técnica que se unen a PD-1 y interrumpen la interacción entre PD-1 y su ligando, PD-L1, y estimulan una respuesta inmunitaria antitumoral, son adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente descripción. En ciertas modalidades, el anticuerpo o porción de unión al antígeno de este se une específicamente a PD-1. Por ejemplo, los anticuerpos que se dirigen a PD-1 incluyen, *por ejemplo*, nivolumab (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb), pembrolizumab (lambrolizumab, MK03475, Merck) y cemiplimab (REGN-2810, Regeneron). Otros anticuerpos adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente descripción son anticuerpos anti-PD-1 descritos en la patente de Estados Unidos núm. 8,008,449, incorporada en la presente descripción como

referencia. En algunas modalidades, el anticuerpo o porción de unión al antígeno de este se une específicamente a PD-L1 e inhibe su interacción con PD-1, aumentando así la actividad inmunitaria. Los anticuerpos conocidos en la técnica que se unen a PD-L1 y interrumpen la interacción entre PD-1 y PD-L1, y estimulan una respuesta inmunitaria antitumoral, son
5 adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, los anticuerpos que se dirigen a PD-L1 incluyen BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) y MPDL3280A (Genetech). Otros anticuerpos adecuados que se dirigen a PD-L1 se describen en la patente de Estados Unidos núm. 7,943,743. Un experto entenderá que cualquier anticuerpo que se una a PD-1 o PD-L1, interrumpe la interacción PD-1/PD-L1 y estimula una respuesta inmunitaria
10 antitumoral, es adecuado para su uso en los métodos descritos en la presente descripción.

Debe entenderse que los anticuerpos dirigidos a puntos de control inmunitarios adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente descripción no se limitan a los descritos supra. Además, un experto en la técnica entenderá que otras dianas de puntos de control inmunitarios también pueden ser dianas por antagonistas o anticuerpos en los métodos descritos en la
15 presente descripción, siempre y cuando el direccionamiento dé como resultado la estimulación de una respuesta inmunitaria antitumoral como se refleja en, *por ejemplo*, un aumento en la proliferación de células T, activación potenciada de células T y/o aumento de la producción de citocinas (*por ejemplo*, IFN-g, IL-2).

En algunas modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción se administran
20 en combinación con un anticuerpo biespecífico específico para un antígeno asociado a un tumor (TAA) y una molécula estimuladora. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es específico para un TAA y CD3. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es específico para un TAA y CD28.

Como se usa en la presente descripción, “antígeno asociado al tumor” y “TAA” se refieren a

antígenos específicos del tumor (*es decir*, antígenos que se encuentran solo en células cancerosas) y antígenos expresados en elevación en células cancerosas o tumorales con relación a células sanas. Los ejemplos no limitantes de un antígeno asociado a un tumor incluyen AFP, ALK, proteínas BAGE, β -catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, anhidrasa carbonosa IX, caspase-8, CCR5, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, cyclin-B1, CYP1B1, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, Proteínas GAGE (p. ej., GAGE-1, -2), GD2, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERC, LMP2, MART-1, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PRLR, Proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, survivin, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, tirosinasa, uroplaca-3, receptor de folato alfa (FR α), integrina $\alpha\beta$ 6, Antígeno de maduración de células B (BCMA), B7-H3 (CD276), B7-H6, anhidrasa carbonosa IX (CAIX), CCR1, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD133, CD135 (también conocido como tirosina cinasa similar a fmc 3; FLT3), CD138, CD171, antígeno carcinoembrionario (CEA), Claudin-6 (CLDN6), Molécula similar a la lectina tipo C 1 (CLL-1), Subconjunto 1 de CD2 (CS-1), sulfato de condroitina proteoglicano 4 (CSPG4), antígeno 1 asociado al linfoma de células T cutáneas (CTAGE1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII), glicoproteína epitelial 2 (EGP2), glicoproteína epitelial 40 (EGP40), molécula de adhesión celular epitelial (EPCAM), receptor 2 de efrina tipo A (EPHA2), proteína de activación de fibroblastos (FAP), Receptor de Fc tipo 5 (FCRL5), receptor de acetilcolinesterasa fetal (AChR), ganglida G2 (GD2), G3 del ganglioide (GD3), Glypican-3 (GPC3), Familia de EGFR, incluido ErbB2 (HER2), IL-11R α , IL-13R α 2, Kappa, cáncer/antígeno 2 del testículo (LAGE-1A), Lambda, Lewis-Y (Ley), Molécula de adhesión celular L1 (L1-CAM), miembro 2 de la subfamilia B del receptor similar a la

inmunoglobulina leucocitaria (LILRB2); gen del antígeno del melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGEA10, antígeno de melanoma reconocido por las células T 1 (MelanA o MART1), Mesotelina (MSLN), molécula de adhesión celular neuronal (NCAM), cáncer/antígeno 1 del testículo (NY-ESO-1), ácido polisálico; Específico para placenta 1 (PLAC1), antígeno 5 expresado preferentemente en melanoma (PRAME), antígeno de células madre prostáticas (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor receptor similar a tirosina cinasa receptor huérfano 1 (ROR1), sarcoma sinovial, X punto de interrupción 2 (SSX2), glicoproteína 72 asociada a tumor (TAG72), Inmunoglobulina de linfocitos T y dominio mucinílico que contiene 3 (TIM-3), marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248), relacionado con el 10 marcador endotelial tumoral 7 (TEM7R), trofoblastos glicoproteína (TPBG), Ligandos NKG2D, receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), y tumor de Wilms 1 (WT-1).

Todas las publicaciones, solicitudes de patentes y patentes emitidas citadas en esta descripción se incorporan en la presente descripción como referencia como si cada publicación individual, solicitud de patente o patente emitida se indicara específica e individualmente para incorporarse 15 como referencia.

Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y de ejemplo para fines de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. 20 Los siguientes ejemplos se proporcionan solo a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

DISEÑO INICIAL DE RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO (CAR) ANTI-MUC16

Se generaron receptores de antígeno quimérico (CAR) dirigidos a MUC16 que tenían aglutinantes scFv dirigidos a un fragmento de MUC16 que permanece en la superficie de una célula después de la escisión proteolítica (ver fragmento de MUC16 SEQ ID NO: 39). La **Figura 1** es un esquema del polipéptido MUC16 y muestra el fragmento (“nub”) que permanece en la superficie celular después de la escisión. Específicamente, los CAR se diseñaron para tener aglutinantes scFv anti-MUC16 tanto en orientaciones VH-VL (H-L) como VL-VH (L-H), una bisagra CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio de señalización coestimuladora de 4-1BB y un dominio de señalización de CD3 ζ (SEQ ID NO: 1-12 y 41-150). También se diseñaron los CAR BB4020 y BB4021, que comprenden un aglutinante MUC16 conocido, un dominio coestimulador de 41BB o CD28, respectivamente, y un dominio de señalización de CD3 ζ .

Tabla 3:

CAR Anti-MUC16	Descripción	Títulos	Aglutinante Kd	Depósito de epítomos
pBB4000	7135 H-L; BBz	8.57×10^7	1.05e-8	1
pBB4001	7135 L-H; BBz	1.03×10^7	1.05e-8	1
pBB4002	7138 H-L; BBz	6.55×10^7	3.21e-10	2
pBB4003	7138 L-H; BBz	4.54×10^7	3.21e-10	2
pBB4004	8755 H-L; BBz	1.10×10^8	1.24e-10	3
pBB4005	8755 L-H; BBz	2.38×10^8	1.24e-10	3
pBB4006	8767 H-L; BBz	2.74×10^8	1.01e-9	1
pBB4007	8767 L-H; BBz	7.17×10^7	1.01e-9	1
pBB4008	8794 H-L; BBz	2.98×10^8	5.54e-10	3

pBB4009	8794 L-H; BBz	4.62×10^5	5.54e-10	3
pBB4010	8799 H-L; BBz	2.24×10^8	8.26e-10	2
pBB4011	8799 L-H; BBz	1.06×10^8	8.26e-10	2
pBB4012	8804 H-L; BBz	7.86×10^7	1.86e-9	1
pBB4013	8804 L-H; BBz	1.32×10^7	1.86e-9	1
pBB4014	8808 H-L; BBz	9.67×10^5	2.77e-10	4
pBB4015	8808 L-H; BBz	4.23×10^7	2.77e-10	4
pBB4016	8810 H-L; BBz	1.68×10^7	1.12e-9	2
pBB4017	8810 L-H; BBz	2.55×10^7	1.12e-9	2
pBB4018	8813 H-L; BBz	5.35×10^7	3.2e-10	5
pBB4019	8813 L-H; BBz	3.46×10^7	3.2e-10	5
pBB4020	aMUC16 CAR; BBz	7.42×10^7		
pBB4021	aMUC16 CAR; CD28z	6.14×10^7		

EJEMPLO 2

EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS IN VITRO DEL CAR ANTI-MUC16

Diez scFv de anticuerpos se convirtieron en CAR en la orientación de luz pesada y pesada para producir 20 construcciones de CAR anti-MUC16 (**Tabla 4**). Cada constructo se transdujo a través de vectores lentivirales (LVV) en células T derivadas de donantes sanos y se tamizó para determinar el número de copias del vector (VCN) (**Figura 2**), la expresión de CAR (**Figura 3**) y la actividad dependiente e independiente del antígeno (**Figuras 4A-4D**). La actividad dependiente del antígeno se evaluó mediante IFN γ liberado en cocultivos de células CAR-T con células tumorales positivas para antígeno (OVCAR3) o negativas (Jurkat, PANC-1), mientras que la actividad independiente del antígeno se evaluó mediante IFN γ liberado en cultivos solo de células

T. Se evaluó el número de copias del vector (VCN) para evaluar la eficiencia de la transducción del LVV. De los 20 CAR tamizados, se despriorizaron 6 constructos: 3 constructos de células T mínimamente transducidas (**Figura 2**: BB4009, BB4013, BB4014); y de los constructos que se transdujeron bien (*es decir*, VCN > 1), 3 productos CAR-T mostraron baja expresión de CAR (< 30 %) (**Figura 3**: BB4002, BB4003, BB4016). De los 14 CAR restantes, BB4010 se despriorizó debido a una liberación de IFN γ independiente del antígeno relativamente mayor (**Figura 4A**). De los 13 CAR restantes, 8 mostraron actividad dependiente del antígeno, ya que estos CAR liberaron IFN γ cuando se cultivaron junto con células OVCAR3 (**Figura 4B**), pero no células Jurkat (**Figura 4C**) o PANC-1 (**Figura 4D**). A partir de estos 8 CAR, se seleccionaron BB4000, BB4011 y BB4015 para una caracterización in vitro e in vivo adicional en base a su afinidad de AcM, epítipo de unión y intervalo de reactividad dependiente del antígeno, expresión de CAR >30 %, reactividad pequeña o nula independiente del antígeno y >1 VCN.

EJEMPLO 3

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL CAR ANTI-MUC16 A LA EXPRESIÓN DE MUC16

La sensibilidad farmacológica de BB4000, BB4011 y BB4015 se evaluó contra seis células tumorales negativas al antígeno (**Figura 5**: Jurkat, PANC-1, HUH7, K562, A549 y RD), para demostrar la especificidad del antígeno. La liberación de IFN γ se midió a partir de sobrenadantes recolectados a partir de cocultivos de CAR T o células T no transducidas (UTD) de control con cada línea tumoral negativa para antígeno a una relación 1:1 durante 24 horas. BB4015 demostró la actividad tónica más baja en todos los donantes de los CAR evaluados.

A continuación, se evaluaron BB4000, BB4011 y BB4015 contra células tumorales RD modificadas genéticamente, que expresan de manera estable niveles altos, medios o bajos del ectodominio MUC16 (**Figura 6A**) para la actividad dependiente de antígeno mediante IFN γ liberado en el cocultivo. Las células T CAR o las células T UTD (de tres donantes) se cultivaron

junto con células tumorales RD MUC16-expressing durante 24 horas en una relación 1:1. BB4000 dio como resultado la liberación de IFN γ más alta seguida de BB4015 y BB4011. Se observaron respuestas dependientes del antígeno titulables en todas las condiciones positivas para antígeno (**Figura 6B**).

- 5 La actividad dependiente del antígeno se evaluó adicionalmente mediante IFN γ liberado en el cocultivo de células T CAR o células T UTD control con células tumorales K562 que expresan una cantidad ajustada de antígeno MUC16. El ARNm que codifica el ectodominio de MUC16 (SEQ ID NO: 39) se electroporó en células tumorales K562 que varían de 0.156 μ g a 2.5 μ g de ARNm (**Figura 7A**). Las células T CAR y las células T UTD de tres donantes sanos se cultivaron
- 10 conjuntamente en una relación 1:1 con K562s transfectadas durante 24 horas. K562s demostraron una liberación de IFN γ ajustable contra las condiciones de células tumorales electroporadas (**Figura 7B**). BB4000, BB4011 y BB4015 todos mostraron una liberación de IFN γ dependiente de antígeno de una manera dependiente de la dosis.

- Por último, la citotoxicidad dependiente del antígeno de BB4000, BB4011 y BB4015 se evaluó
- 15 por ciento (%) de muerte de células tumorales. Las células T CAR o las células T UTD, de tres donantes sanos y las células tumorales RD modificadas genéticamente mencionadas anteriormente se cultivaron conjuntamente a relaciones de efector a células T (E:T) 10:1, 5:1 y 2.5:1 durante 72 horas en un analizador de impedancia. Los CAR BB4015, BB4000 y BB4011 mostraron >70 % de citotoxicidad cuando se cultivaron con células tumorales positivas para
 - 20 antígeno medio o alto RD en todas las relaciones E:T (**Figura 8A**). BB4011 y BB4015 mostraron <60 % de citotoxicidad cuando se cultivaron con células tumorales RD positivas para antígenos bajos a una relación E:T 2.5:1, mientras que BB4000 mostró >60 % (**Figura 8B**). BB4000, BB4011 y BB4015 mostraron todos citotoxicidad dependiente del antígeno de una manera dependiente de la dosis.

EJEMPLO 4

EVALUACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS T CAR ANTI-MUC16

Las células T CAR BB4000, BB4011 y BB4015 se caracterizaron por marcadores fenotípicos mediante citometría de flujo. Los marcadores incluyeron CD3, CD4, CD8, CD62L y CD45RA.

- 5 BB4000 dio como resultado un promedio de 45 % de células T CD4+ y un promedio de 36.4 % de células T CD8+; BB4011, 47.1 % de células T CD4+ y 38 % de células T CD8+; BB4015, 60.9 % de células T CD4+ y 29 % de células T CD8+. En comparación con los controles UTD, BB4015 mostraba una mayor expresión de CD62L y CD45RA, lo que apunta a un fenotipo mayor sin tratamiento previo con potencial para una mayor persistencia in vivo, mientras que tanto BB4000
- 10 como BB4011 tenían una menor expresión de CD62L (Figura 9).

EJEMPLO 5

UNIÓN DEL CAR ANTI-MUC16 AL ECTODOMINIO DE MUC16

- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) extraídas de sangre humana, se activaron mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Luego, las células activadas de
- 15 las PBMC se transdujeron con un vector lentiviral que comprende un polinucleótido que codifica el constructo CAR anti-MUC16 BB4015 (ver las SEQ ID NO: 11 y 12). Las células UTD se usaron como una condición de control. Las células transducidas y UTD se expandieron en medio de crecimiento de células T durante 10 días en presencia de IL2.

- Después de la expansión, las células transducidas con CAR anti-MUC16 se cultivaron en placas
- 20 de 96 pocillos recubiertas con antígeno de ectodominio MUC16-nub (SEQ ID NO: 39) a una concentración que varía entre 1.54 ng/mL a 1125 ng/mL o CA125 (polipéptido MUC16 humano que carece del antígeno de ectodominio nub; SEQ ID NO: 40) a concentraciones que varían de 1.37 U/mL a 10,000 U/mL. Las células T CAR anti-MUC16 liberaron niveles crecientes de IFN γ proporcionales a la concentración del ectodominio desnudo de MUC16 (**Figura 10A**), mientras

que la proteína CA125 no provocó ninguna respuesta funcional de las células T CAR anti-MUC16 (**Figura 10B**). Los controles UTD no mostraron ninguna respuesta funcional a MUC16 ni a CA125. Esto ilustra la especificidad del CAR anti-MUC16 al ectodominio MUC16 sobre la porción de CA125 desprendida.

5

EJEMPLO 6

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LAS CÉLULAS T CAR ANTI-MUC16

Las PBMC humanas sanas se recolectaron y activaron mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Luego, las células se transdujeron con vector lentiviral que comprende un polinucleótido que codifica el constructo CAR BB4015 anti-MUC16 (ver SEQ ID NOS: 11 y 12).

10 Las células UTD se usaron como condición de control. Las células transducidas y UTD se expandieron en medio de crecimiento de células T durante 10 días en presencia de IL2.

Las células T CAR UTD o anti-MUC16 se cultivaron conjuntamente en una relación 1:1 con células tumorales OVCAR3 que expresan el antígeno MUC16. 24 horas después del cocultivo, los sobrenadantes se recolectaron y analizaron para determinar la concentración de IFN γ mediante el uso de Luminex. El CAR T anti-MUC16 demostró una liberación de IFN γ específica del antígeno MUC16 en comparación con la condición de control UTD (datos no mostrados).

15

Los ratones NSG hembras *in vivo* se inocularon por vía intraperitoneal con 20×10^6 células OVCAR3.FP que expresan luciferasa. Después de aproximadamente 14 días, cuando los tumores promediaron una carga tumoral de $1,5 \times 10^8$ p/s, los ratones se inyectaron con vehículo, 20 $\times 10^6$ UTD o 20×10^6 células T CAR anti-MUC16. El control tumoral OVCAR3.FP se observó en animales inyectados con células T CAR anti-MUC16 en ~día 5 después de las inyecciones de células T CAR (**Figura 11**). El grupo T CAR anti-MUC16 de n=5 se representan como puntos de datos individuales por cada animal del grupo. A los 28 días después de la inyección de CAR T anti-MUC16, el grupo n=5 de ratones se reexponga a la inyección tumoral de OVCAR3.FP junto

20

con un grupo de ratones de control sin tratamiento previo de NSG que se reinyectaron con células tumorales de OVCAR3.FP. Se observó rechazo tumoral después de la reexposición. La **Figura 11** muestra los grupos vehículo, UTD y OVCAR3.FP para n=5 ratones representados como flujo de luminiscencia medio por grupo.

5

EJEMPLO 7

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CÉLULAS T CAR ANTI-MUC16 EN EL MODELO OVCAR3

Se realizaron estudios *in vivo* en ratones con NSG hembra inoculados con células tumorales OVCAR3 etiquetadas con luciferasa Firefly lo que permitió el monitoreo de la carga tumoral a través de un sistema de obtención de imágenes in vivo (IVIS®; PerkinElmer®). Se inyectaron 20 x 10⁶ células tumorales en el espacio intraperitoneal de ratones hembras y se monitorearon hasta que se alcanzó el volumen tumoral apropiado para la inyección de CAR T. Las células T BB4000, BB4011, BB4017 y BB4015 se inyectaron por vía IV en un volumen total de 0.4 mL a través de la vena de la cola. Los ratones se controlaron para determinar la eficacia de las células T a lo largo del estudio. Cuando se probó in vivo, BB4015 demostró una respuesta más rápida y duradera que BB4011 (**Figura 12A**), BB4000 (**Figura 12B**) y BB4017 (**Figura 12C**).

A continuación, se empleó el modelo de tumor IP OVCAR3.FP como se describió anteriormente. En el día 0, los animales se trataron con una única inyección IV de BB4015 y BB4000 a 20 x 10⁶, 10 x 10⁶ o 3 x 10⁶ celdas/ratón CAR+, celdas UTD o vehículo RPMI (control). El vehículo solo y las células de control UTD no tuvieron efecto sobre la carga tumoral. BB4015 mostró una potencia antitumoral dependiente de la dosis superior en comparación con BB4000 a todas las dosis con la dosis más alta de 20 x 10⁶ células/ratón CAR+ eliminaron los tumores en aproximadamente el día 6 (**Figuras 13A-13C**). En general, estos resultados demuestran que BB4015 controla el crecimiento tumoral de OVCAR3.FP con una mayor potencia antitumoral dependiente de la dosis que otras construcciones.

Tabla 4: LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	Anti-MUC16 8808 CDRL1	QSLSSNY
2	Anti-MUC16 8808 CDRL2	GIS
3	Anti-MUC16 8808 CDRL3	QQYGSSPWT
4	Anti-MUC16 8808 CDRH1	GFTFSNYG
5	Anti-MUC16 8808 CDRH2	ISDDGSFK
6	Anti-MUC16 8808 CDRH3	AKWQHNWNDGGFDY
7	Cadena ligera variable Anti- MUC16 8808	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSLSSNYLAWYRQKPG QAPRLLIYGISSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

5	8	Cadena pesada variable Anti- MUC16 8808
10	9	pBB4015 secuencia CAR a.a. sin péptido señal
15		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGIHWVRQAP GKGLEWVAVISDDGSFKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRVEDSAVYHCAKWQHNWNDGGFDYWGQGTLVTVSS
20	10	pBB4015 secuencia CAR n.a. sin péptido señal
		GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGATACCCTTTCCCTTTC CCCAGGCGAGCGCGCCACACTGTCTTGCAGGGCGTCACA GAGCCTGAGCAGCAACTATCTCGCGTGGTATAGACAGAAA CCAGGGCAAGCCCCACGGCTGCTGATCTATGGAATTAGCT CACGGGCAACAGGAATCCCCGACAGATTCAGTGGGTCTGG GAGCGGAACGGATTTTACCCTGACAATTAGTAGATTGGAAC

5

10

15

20

CGGAAGACTTCGCTGTGTACTATTGCCAGCAGTACGGCTC
 ATCCCCGTGGACCTTCGGACAAGGCACTAAGGTAGAGATC
 AAAGGTGGAGGGGGGCTCAGGGGGAGGCGGAAGCGGAGG
 CGGAGGATCTCAGGTGCAGCTGGTTGAGTCTGGAGGCGG
 AGTCGTTCAGCCAGGTAGGAGCCTCCGACTCTCCTGCGTC
 GCAAGTGGGTTTACGTTTTCCAATTACGGGATTCACTGGGT
 CCGACAGGCCCCCCGGGAAGGGGCTCGAGTGGGTGGCCGT
 TATTAGCGATGACGGGTCTTTCAAGTTCTATGCCGATTCAG
 TCAAAGGTAGATTCACAATTTCAAGGGATAATAGTAAAAATA
 CACTGTACTTGCAAATGAACTCTCTGCGCGTCGAGGATTCA
 GCCGTGTACCATTGCGCGAAATGGCAGCACAAATTGGAATG
 ACGGCGGATTCGATTATTGGGGCCAGGGGCACACTTGTAAC
 TGTGTCAAGCACCAACAACACCTGCTCCAAGGCCCCCACA
 CCCGCTCCAACATAGCCAGCCAACCATTGAGCCTCAGAC
 CTGAAGCTTGCAGGCCCGCAGCAGGAGGCGCCGTCCATA
 CGCGAGGCCTGGACTTCGCGTGTGATATTTATATTTGGGCC
 CCTTTGGCCGGAACATGTGGGGTGTTGCTTCTCTCCCTTGT
 GATCACTCTGTATTGTAAGCGCGGGAGAAAGAAGCTCCTGT
 ACATCTTCAAGCAGCCTTTTATGCGACCTGTGCAAACCACT
 CAGGAAGAAGATGGGTGTTTCATGCCGCTTCCCCGAGGAGG
 AAGAAGGAGGGTGTGAACTGAGGGTGAAATTTTCTAGAAG
 CGCCGATGCTCCCGCATATCAGCAGGGTCAGAATCAGCTC
 TACAATGAATTGAATCTCGGCAGGCGAGAAGAGTACGATGT
 TCTGGACAAGAGACGGGGCAGGGATCCCGAGATGGGGGG

5		AAAGCCCCGGAGAAAAAATCCTCAGGAGGGGTTGTACAAT GAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCTGAAGCCTATAGCGAGA TCGGAATGAAAGGCGAAAGACGCAGAGGCAAGGGGCATG ACGGTCTGTACCAGGGTCTCTCTACAGCCACCAAGGACAC TTATGATGCGTTGCATATGCAAGCCTTGCCACCCCGC
10	11 pBB4015 secuencia CAR a.a. con péptido señal	MALPVTALLPLALLLHAARPEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSC RASQSLSSNYLAWYRQKPGQAPRLLIYGISSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK GGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVAS GFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVAVISDDGSFKFYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDSAVYHCAKWQHNWNDGGF DYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
20	12 pBB4015 secuencia de CAR n.a. con péptido señal	ATGGCCCTGCCGGTTACCGCTCTCTTGCTGCCCTGGCGC TGCTTCTGCACGCGGCAAGACCCGAAATTGTGCTGACCCA GAGCCCCGATACCCTTTCCCTTTCCCCAGGCGAGCGCGCC ACACTGTCTTGACAGGGCGTCACAGAGCCTGAGCAGCAACT ATCTCGCGTGGTATAGACAGAAACCAGGGCAAGCCCCACG

5

10

15

20

GCTGCTGATCTATGGAATTAGCTCACGGGCAACAGGAATCC
 CCGACAGATTCAGTGGGTCTGGGAGCGGAACGGATTTTAC
 CCTGACAATTAGTAGATTGGAACCGGAAGACTTCGCTGTGT
 ACTATTGCCAGCAGTACGGCTCATCCCCGTGGACCTTCGG
 ACAAGGCACTAAGGTAGAGATCAAAGGTGGAGGGGGCTCA
 GGGGGAGGCGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTCAGGTGCAG
 CTGGTTGAGTCTGGAGGCGGAGTCGTTCAAGCCAGGTAGGA
 GCCTCCGACTCTCCTGCGTCGCAAGTGGGTTTACGTTTTCC
 AATTACGGGATTCAGTGGGTCCGACAGGCCCCCGGGAAGG
 GGCTCGAGTGGGTGGCCGTTATTAGCGATGACGGGTCTTT
 CAAGTTCTATGCCGATTCAGTCAAAGGTAGATTCACAATTC
 AAGGGATAATAGTAAAAATACACTGTACTTGCAAATGAACTC
 TCTGCGCGTCGAGGATTCAGCCGTGTACCATTGCGCGAAA
 TGGCAGCACAATTGGAATGACGGCGGATTGATTATTGGG
 GCCAGGGCACACTTGTAAGTGTGTCAAGCACCACAACACCT
 GCTCCAAGGCCCCCACACCCGCTCCAAGTATAGCCAGCC
 AACCATTGAGCCTCAGACCTGAAGCTTGACAGGCCCCGCAGC
 AGGAGGCGCCGTCCATACGCGAGGCCTGGACTTCGCGTGT
 GATATTTATATTTGGGCCCCCTTTGGCCGGAACATGTGGGGT
 GTTGCTTCTCTCCCTTGTGATCACTCTGTATTGTAAGCGCG
 GGAGAAAGAAGCTCCTGTACATCTTCAAGCAGCCTTTTATG
 CGACCTGTGCAAACCACTCAGGAAGAAGATGGGTGTTCAT
 GCCGCTTCCCCGAGGAGGAAGAAGGAGGGTGTGAACTGA
 GGGTGAAATTTTCTAGAAGCGCCGATGCTCCCGCATATCAG

5			CAGGGTCAGAATCAGCTCTACAATGAATTGAATCTCGGCAG GCGAGAAGAGTACGATGTTCTGGACAAGAGACGGGGCAGG GATCCCGAGATGGGGGGAAAGCCCCGGAGAAAAAATCCTC AGGAGGGGTTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGC TGAAGCCTATAGCGAGATCGGAATGAAAGGCGAAAGACGC AGAGGCAAGGGGCATGACGGTCTGTACCAGGGTCTCTCTA CAGCCACCAAGGACACTTATGATGCGTTGCATATGCAAGCC TTGCCACCCCGC
10	13	Secuencia a.a de MUC16 humano	MLKPSGLPGSSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATLSPK TSTGAIVVTEHTLPFTSPDKTLASPTSSVVGRTTQSLGVMSSA LPESTSRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATSMVSGLS SPRTRTSSTEGNFTKEASTYTLTVETTSGPVTEKYTVPTETST TEGDSTETPWDTRYIPVKITSPMKTFADSTASKENAPVSMTPA ETTVTDSHTPGRTNPSFGTLYSSFLDLSPKGTPNSRGETSLEL ILSTTGYPFSSPEPGSAGHSRISTSAPLSSSASVLDNKISETSIF SGQSLTSPLSPGVPEARASTMPNSAIPFSMTLSNAETSAERVR STISLGTSPSISTKQTAETILTFHAFETMDIPSTHIAKTLASEWL GSPGTLGGTSTSALTSTSPSTTLVSEETNTHHSTSGKETEGTL NTSMTPLETSAPGEESEMTATLVPTLGFTTLDSKIRSPSQVSS SHPTRELRTTGSTSGRQSSSTA AHGSSDILRATTSSTSKASS WTSESTAQQFSEPQHTQWVETSPSMKTERPPASTSVAAPITT SVPSVVS GFTTLKTSSTKGIWLEETSADTLIGESTAGPTTHQFA VPTGISMTGGSSTRGSQGTTHLLTRATASSETSADLTLATNGV
15			
20			

5

10

15

20

PVSVSPAVSKTAAGSSPPGGTKPSYTMVSSVIPETSSLQSSAF
 REGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDSAGHTKISTSIPLLSSASVLE
 DKVSATSTFHHKATSSITTGTPEISTKTKPSSAVLSSMTLSNA
 ATSPERVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTLSTSAETTDSPNI
 HPTGTLTSESSESPSTLSLPSVSGVKTTFSSSTPSTHLFTSGE
 ETEETSNPSVSQPETSFSRVRTTLASTSVPTPVFPTMDTWPT
 RSAQFSSSHLVSELRATSSTSVTNSTGSALPKISHLTGTATMS
 QTNRDTFNDSAAPQSTTWPETSPRFKTGLPSATTTVSTSATS
 LSATVMVSKFTSPATSSMEATSIREPSTTILTTETTNGPGSMAV
 ASTNIPIGKGYITEGRDLTSHLPIGTTASSETSMDFTMAKESVS
 MSVSPSQSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVYHLTSREITIPR
 DGTSSALTPQMTATHPPSPDPGSARSTWLGLSSSPSSPTPK
 VTMSSTFSTQRVTTSMIMDTVETSRWNMPNLPSTTSLTPSNIP
 TSGAIGKSTLVPLDTPSPATSLEASEGGLPTLSTYPESTNTPSI
 HLGAAHASSES PSTIKLTMA SVVKPGSYTPLTFPSIETHIVSTA
 RMAYSSGSSPEMTAPGETNTGSTWDPTTYITTTDPKDTSSAQ
 VSTPHSVRTLRTTENHPKTESATPAAYSGSPKISSSPNLTPA
 TKAWTITDTTEHSTQLHYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPT
 SPTIGSSTLELTSDVPGEPLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTE
 EMASTDLDISSPSSPMSTFAIFPPMSTPSHELKSEADTSAIRN
 TDSTTLDQHLGIRSLGRTGDLTTVPITPLTTTWT SVIEHSTQAQ
 DTLSATMSPTHVTQSLKDQTSIPASASPSHLTEVYPELGTQGR
 SSSEATTFWKPSTD TLSREIETGPTNIQSTPPMDNTTTGSSSS
 GVTLGIAHLPIGTSSPAETSTNMALERRSSTATVSMAGTMGLL

5

10

15

20

VTSAPGRSISQSLGRVSSVLSESTTEGVTDSSKGSSPRLNTQ
 GNTALSSSLEPSYAEGSQMSTSIPLTSSPTTPDVEFIGGSTFW
 TKEVTTVMTSDISKSSARTESSSATLMSTALGSTENTGKEKLR
 TASMDLPSPTPSMEVTPWISLTLSNAPNTTDSLDSLHGVHTSS
 AGTLATDRSLNTGVTRASRENGSDTSSKSLSMGNSTHTSMT
 YTEKSEVSSSIHPRPETSAPGAETTLTSTPGNRAISLTLPFSSIP
 VEEVISTGITSGPDINSAPMTHSPITPPTIVWTSTGTIEQSTQPL
 HAVSSEKVSQVQTQSTPYVNSVAVSASPHTENS SVSSGSSTSSP
 YSSASLES LDSTISRRNAITSWLWDLTTLPTTTWPSTSLSEAL
 SSGHSGVSNPSSTTTEFPLFSAASTSAKQARNPETETHGPQN
 TAASTLNTDASSVTGLSETPVGASISSEVPLPMAITSRSDVSGL
 TSESTANPSLGTASSAGTKLTRTISLPTSESLVSFRMNKDPWT
 VSIPLGSHPTTNTETSIPVNSAGPPGLSTVASDVIDTPSDGAES
 IPTVSFSPSPDTEVTTISHFPEKTTHSFRTISSLTHELTSRVTPIP
 GDWMSSAMSTKPTGASPSITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASFT
 ETSTVSLDNETTVKTS DILDARKTNELPSDSSSSSDLINTSIASS
 TMDVTKTASISPTSISGMTASSSPSLFSSDRPQVPTSTTETNTA
 TSPSVSSNTYSLDGGSNVGGTPSTLPPFTITHPVETSSALLAW
 SRPVRTFSTMVSTD TASGENPTSSNSVVT SV PAPGTWTSVGS
 TTDLPAMGFLKTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPHLSAAVVTGS
 SATSEASLLTTSESKAIHSSPQTPTTPTSGANWETSATPESLLV
 VTETSDTTLTSKILVTDITLFTVSTPPSKFPSTGTLSGASFPTL
 LPDTPAIPLTATEPTSSLATSFDSTPLVTIASDSLGTVPETTLTM
 SETSNGDALVLKTVSNPDRSIPGITIQGVTESPLHPSSTSPSKIV

5

10

15

20

APRNTTYEGSITVALSTLPAGTTGSLVFSQSSSENSETTALVDS
 SAGLERASVMPLTTGSQGMASGGIRSGSTHSTGKTFSSLP
 LTMNPGEVTAMSEITTNRLTATQSTAPKGIPVKPTSAESGLLTP
 VSASSSPSKAFASLTAPPTWGIPQSTLTFFEFSEVPSLDTKSA
 SLPTPGQSLNTIPDSDASTASSLSKSPEKNPRARMMTSTKAI
 SASSFQSTGFTETPEGSASPSMAGHEPRVPTSGTGDPRIAS
 EMSYDPDSKASSAMTSTSLASKLTTLFSTGQAARSGSSSSPI
 SLSTEKETSFLSPTASTSRKTSFLGPSMARQPNILVHLQTSAL
 TLSPTSTLNMSQEEPELTSSQTIAEEEGTTAETQTLTFTPSET
 PTSLLPVSSPTEPTARRKSSPETWASSISVPAKTSLVETTDGTL
 VTTIKMSSQAAQGNSTWPAPAEETGSSPAGTSPGSPPEMSTTL
 KIMSSKEPSISPEIRSTVRNSPWKTPETTVPMETTVEPVTLQST
 ALGSGSTSISHLPTGTTSPTKSPTENMLATERVSLSPSPPEAW
 TNLYSGTPGGTRQSLATMSSVSLESPTARSITGTGQQSSPEL
 VSKTTGMEFSMWHGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDPVTSPN
 SVSSLTDKSKHKTETWVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVD
 EAYSSTSSWSDQTSBGDITLGASPDVTNTLYITSTAQTTSVLVSL
 PSGDQGITSLTNPSSGGKTSSASSVTSPSIGLETLRANVSAVKS
 DIAPTAGHLSQTSSPAEVSILDVTTAPTGPSTTTITTMGTNSIST
 TTPNPEVGMSTMDSTPATERRTTSTHEPSTWSSTAASDSWT
 VTDMTSNLKVARSPGTISTMHTTSFLASSTELDSMSTPHGRIT
 VIGTSLVTPSSDASAVKTETSTSERLSPSDTTASTPISTFSRV
 QRMSISVPDILSTSWTPSSTEAEVPSMVSTDHASTKTDPNP
 PLSTFLFDLSTLDWDTGRSLSSATATTSAAPQGATTPQELTLE

5

10

15

20

TMISPATSQLPFSIGHTSAVTPAAMARSSGVTFSRPDPTSKKA
 EQTSTQLPTTTSAHPGQVPRSAATTLDVIPHTAKTPDATFQRQ
 GQTALTTEARATSDSWNEKEKSTPSAPWITEMMNSVSEDTIK
 EVTSSSSVLRTLNTLDINLESGTTSSPSWKSSPYERIAPESESTT
 DKEAHPSTNTVETTGWVTSSEHASHSTIPAHSASSKLTSPVV
 TTSTREQAIVSMSTTTWPESTRARTEPNSTFLTIELRDVSPYMD
 TSSTTQTSIISSPGSTAITKGPRTEITSSKRISSSFLAQSMRSSD
 SPSEAITRLSNFPAMTESGGMILAMQTSPPGATSLSAPTLDTS
 ATASWTGTPLATTQRFTYSEKTTLFSKGPEDTSQPSPPSVEET
 SSSSSLVPIHATTSPSNILLTSQGHSPSSTPPVTSVFLSETSGL
 GKTTDMSRISLEPGTSLPPNLSSTAGEALSTYEASRDTKAIHH
 SADTAVTNMEATSSEYSPIPGHTKPSKATSPLVTSHIMGDITSS
 TSVFGSSETTEIETVSSVNQGLQERSTSQVASSATETSTVITHV
 SSGDATTHVTKTQATFSSGTSISSPHQFITSTNTFTDVSTNPST
 SLIMTESSGVTTITTQTGPTGAATQGPYLLDTSTMPYLTETPLAV
 TPDFMQSEKTTLISKGPKDVSWTSPPSVAETSYPPSSLTPFLVT
 TIPPATSTLQGQHTSSPVSATSVLTSGLVKTTDMLNTSMEPVT
 NSPQNLNNPSNEILATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGTASSAH
 VLHSTLPVSSEPSTATSPMVPASSMGDALASISIPGSETTDIEG
 EPTSSLTAGRKENSTLQEMNSTTESNIILSNVSVGAITEATKME
 VPSFDATFIPTPAQSTKFPDIFSVASSRLSNPPMTISTHMTTT
 QTGSSGATSKIPLALDTSTLETSAGTPSVVTEGFAHSKITTAMN
 NDVKDVSQTNPPFQDEASSPSSQAPVLVTTLPSSVAFTPQWH
 STSSPVSMSSVLTSSLVKTAGKVDTSLETVTSSPQSMSNTLDD

5

10

15

20

EMAITNQTGPIGTISQATLTLDTSSTASWEGTHSPVTQRFPHS
 EETTTMSRSTKGVSWQSPPSVEETSSPSSPVPLPAITSHSSLY
 SAVSGSSPTSALPVTSLLTSGRRKTIDMLDTHSELVTSSLPSAS
 SFSGEILTSEASTNTETIHFSENTAETNMGTNSMHKLHSSVSI
 HSQPSGHTPPKVTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSP
 LTPELKEDSTALVMNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVTYY
 DPTFMPASAQSTKSPDISPEASSSHSNSPPLTISTHKTATQTG
 PSGVTSLGQLTLDTSTIATSAGTPSARTQDFVDSETTSVMNND
 LNDVLKTSPFSAEEANSLSSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTS
 SLVSVTSVPTPTLAKITDMDTNLEPVTRSPQNLNRNTLATSEATT
 DTHTMHPSINTAVANVGTTSSPNEFYFTVSPDSDPYKATSAVV
 ITSTSGDSIVSTSMPRSSAMKKIESETTFSLIFRLRETSTSQKIG
 SSSDTSTVFDKAFTAATTEVSRTELTSRSSRTSIQGTEKPTMSP
 DTSTRSVTMLSTFAGLTKEERTIATQTGPHRATSQGTLTWDT
 SITTSQAGTHSAMTHGFSQLDLSTLTSRVPEYISGTSPPSVEK
 TSSSSSLLSLPAITSPSPVPPTLPESRPSSPVHLTSLPTSGLVK
 TTDMLASVASLPPNLGSTSHKIPTTSEDIKDTEKMYPSTNIAVT
 NVGTTTSEKESYSSVPAYSEPPKVTSPMVTSFNIRDTIVSTSM
 PGSSEITRIEMESTFSLAHGLKGTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLT
 TGATETSRTEVASSRRTSIPGPDHSTESPDISTEVIPSLPISLGI
 TESSNMTIITRTGPPLGSTSQGTFTLDTPTTSSRAGTHSMATQ
 EFPHSEMTTVMNKDPEILSWTIPPSIEKTSFSSSLMPSPAMTS
 PPVSSTLPKTIHTTPSPMTSLLTPSLVMTTDTLGTSPPEPTTSSP
 PNLSSTSHEILTDEDTTAIEAMHPSTSTAATNVETTSSGHGS

5

10

15

20

QSSVLADSEKTKATAPMDTTSTMGHTTVSTSMSVSSETTKIKR
 ESTYSLTPGLRETSISQNASFSTDTSIVLSEVPTGTAEVSRTE
 VTSSGRTSIPGPSQSTVLPEISTRMTMLFASPTMTESAEMTIP
 TQTGPSGSTSQDTLTLDTSTTKSQAKTHSTLTQRFPHSEM TTL
 MSRGPGDMSWQSSPSLENPSSLPSLLSLPATTSPPPISSTLPV
 TISSSPLPVTSLLTSSPVTTTDM LHTSPELVTSSPPKLSHTSDE
 RLTTGKDTTNT EAVHPSTNTAASNVEIPSSGHESPSSALADSE
 TSKATSPMFITSTQEDTTVAISTPHFLETSRIQKESISSLSPKLR
 ETGSSVETSSAIETSAVLSEVSIGATTEISRTEVTSSSRTSISGS
 AESTMLPEISTTRKIIKFPTSPILAESSEMTIKTQTSPPGSTSEST
 FTLDTSTTPSLVITHSTMTQRLPHSEITTLVSRGAGDVPRPSSL
 PVEETSPSSQLSLSAMISPSPVSSTLPASSHSSSASVTSL LTP
 GQVKTTEVL DASAEPETSSPPSLSSTSVEILATSEVTTDTEKIH
 PFSNTAVTKVGTSSSGHESPSSVLPDSETTKATSAMGTISIMG
 DTSVSTLTPALSNTRKIQSEPASSLTTRLRETSTSEETSLATEA
 NTVLSKVSTGATTEVSRTEAISFSRTSMMSGPEQSTMSQDISIG
 TIPRISASSVLTESAKMTITTQTGPSESTLESTLNLNTATTPSWV
 ETHSIVIQQGFHPPEMTTSMGRGPGGVSWPSPPFVKETSPPSS
 PLSLPAVTSPHPVSTTFLAHIPPSPLPVTSLLTSGPATTTDILGT
 STEPGTSSSSSLSTTSHERLTTYKDTAHT EAVHPSTNTGGTNV
 ATTSSGYKSQSSVLADSSPMCTTSTMGDTSVLTSTPAFLETR
 RIQTELASSLTPGLRESSGSEGTSSGTKMSTVLSKVPTGATTEI
 SKEDVTSIPGPAQSTISPDISTR TVSWFSTSPVMTESAEITMNT
 HTSPLGATTQGTSTLDTSSSTSLTMTHSTISQGFSHSQMSTLM

5

10

15

20

RRGPEDVSWMSPPLLEKTRPSFSLMSSPATTSPSPVSSTLPE
 SISSSPLPVTSLLTSGLAKTTDMLHKSSEPVTNSPANLSSTSVE
 ILATSEVTTDTEKTHPSSNRTVTDVGTSSSGHESTSFVLADSQ
 TSKVTSPMVITSTMEDTSVSTSTPGFFETSRIQTEPTSSLTLGL
 RKTSSSEGTSLATEMSTVLSGVPTGATAEVS RTEVTSSSRTSI
 SGFAQLTVSPETSTETITRLPTSSIMTESAEMMIKTQTDPPGST
 PESTHTVDISTTPNWWETHSTVTQRFHSEM TTLVSRSPGDM
 LWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSPVSSTLVEDFPSASLP
 VTSLLNPGLVITTD RMGISREPGTSSTS NLSSTSHERLTTLEDT
 VDTEDMQPSTHTAVTNVRTSISGHESQSSVLSDSETPKATSP
 MGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIEPTSSLTSGLRETSSE
 RISSATEGSTVLSEVPSGATTEVSRTEVISSRGTSMSGPDQFTI
 SPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGTLTLDTS
 TTTFWSGTHSTASPGF HSEM TTLMSRTPGDVPWPSLPSVE
 EASSVSSSLSSPAMTSTSFFSTLPESISSSPHPVTALLTLGPVK
 TTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTS AEILATSEVTKDREKIHPSN
 TPVVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNTSVS
 TSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLSG
 MPTGATTKVS RTEALSLGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRISTP
 LTTTGSAEMTITPKTGHSGASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSA
 ATHRSPHSGMTTPMSRGPEDVSWPSRPSVEKTSPPSLVSL
 SAVTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTS LFTPVM MKTTDMLDTSL
 EPVTTSPPSMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTI
 SARQEFYSSYPGLPEPSKVTSPVVTSSTIKDIVSTTIPASSEITRI

5

10

15

20

EMESTSTLTPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPYKALTSATIEDSM
 TQVMSSSRGPPSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTESTEMTIT
 TQTGSPGATSRGTLTLDSTTFMSGTHSTASQGFHSQMTAL
 MSRTPGDVPWLSHPSVEEASSASFSLSSPVMTSSSPVSSTLP
 DSIHSSSLPVTSLLTSGLVKTTTELLGTSSEPETSSPPNLSSTSA
 EILAITEVTTDTEKLEMTNVVTSGYTHESPSSVLADSVTTKATS
 SMGITYPTGDTNVLSTPAFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSIS
 EETSSATEKSTVLSSVPTGATTEVSRTEAISSSRTSIPGPAQST
 MSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTGPSGATSQGTFTL
 DSSSTASWPGTHSATTQRFQSVVTPMSRGPEDVSWPSPL
 SVEKNSPSSLVSSSSVTSPSPLYSTPSGSSHSSPVPVTSLFT
 SIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNITSDESLAASKATTETEAI
 HVFENTAASHVETTSATEELYSSSPGFSEPTKVISPVVTSSSIR
 DNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPGLRETRTSQDITSSTET
 STVLYKMPSGATPEVSRTEVMPSSRTSIPGPAQSTMSLDISDE
 VVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQVTLPLGTSMTFLSG
 THSTMSQGLSHSEMNLMSRGPESLSWTSPRFVETTRSSSSL
 TSLPLTTSLSPVSSTLLDSSPSSPLPVTSLILPGLVKTTEVLDT
 SEPKTSSSPNLSSTSVEIPATSEIMTDTEKIHPSSENTAVAKVRT
 SSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITSADVDDTTVFTSNPAFSE
 TRRIPTPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSAVLYGVPTSATTE
 VSMTEIMSSNRIHIPDSDQSTMSPDIITEVITRLSSSSMMSEST
 QMTITTQKSSPGATAQSTLTATTAPLARTHSTVPPRFLHSE
 MTTLMSPENPSWKSSLFVEKTSSSSSLLSLPVTTSPSVSST

5

10

15

20

LPQSIPSSSFVTSLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNLSGTSVE
 ILAASEVTTDTEKIHPSSSMAVTNVGTTSSGHELYSSVSIHSEP
 SKATYPVGPSSMAETSISTSMFANFETTGFEEPFSLTSGF
 RKTNMSLDTSSVPTNTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSP
 DWPPASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITSFPESRFTMSVTE
 STHHLSTDLLPSAETISTGTVMPSLSEAMTSFATTGVPRAISGS
 GSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVPFSSSTFTTTDSSTI
 PALHEITSSSATPYRVDTSLGTESSTTEGRLVMVSTLDTSSQP
 GRTSSSPILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRTDGIME
 HITKIPNEAAHRGTIRPVKGPQTSTSPASPKGLHTGGTKRMET
 TTTALKTTTTALKTTSRATLTTSVYTPTLGTLTPLNASMQMAST
 IPTEMMITTPYVFPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTTSPSVFN
 RESETTASLVSRGAERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAE
 TIPTVSKTTPNFFHSELDTVSSTATSHGADVSSAIPTNISPELD
 ALTPLVTISGTDSTTFPTLTKSPHETETRTTWLTHPAETSSTIP
 RTIPNFSHHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTS
 QVTSSGTDRNMTIPTLTLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSSAIPTS
 TISPAVSRLVTSMVTSLAAKTSTTNRALTNSPGEPATTVSLVTH
 PAQTSPTVPWTTSIFFHSKSDTTSPMTTSHGAESSAVPTPTV
 STEVPGVVTPLVTSSRAVISTTIPILTSPGEPETTPSMATSHGE
 EASSAIPPTVSPGVPGVVTSLVTSSRAVTSTTIPILTFSLGEPE
 TTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMVTSLVASSRAVTSTTL
 PTLTLSPGEPETTPSMATSHGAESSTVPTVSPEVPGVVTSLV
 TSSSGVNSTSIPTLILSPGELETTTPSMATSHGAESSAVPTPTV

5

10

15

20

SPGVSGVVTPLVTSSRAVTSTTIPILTLSSSEPETTPSMATSHG
 VEASSAVLTVSPEVPGMVTSLVTSSRAVTSTTIPTLTISSDEPE
 TTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPTVQGLVTSVLTSSGSETSAF
 SNLTVASSQPETIDSWVAHPGTEASSVVPTLTVSTGEPFTNISL
 VTHPAESSSTLPRTTSRFSHSELDTMPSTVTSPEAESSAISTT
 ISPGIPGVLTSVLTSSGRDISATFPTVPESPHSEATASWVTHP
 AVTSTTVPRTPPNYSHSEPDTTPSIATSPGAEATSDFPTITVSP
 DVPDMVTSQVTSSGTDTSITIPTLTLSSGEPETTTSFITYSEHT
 SSAIPTLPVSPGASKMLTSLVISSGTDSTTTFPTLTETPYEPETT
 AIQLIHPAETNTMVPRTTPKFSHSKSDTTLPVAITSPGPEASSA
 VSTTTISPDMSDLVTSVLPSSGTDSTTTFPTLSETPYEPETTAT
 WLTHPAETSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTSPGVDTRSGV
 PTTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGEPETTASSA
 THPGTQTGFTVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTSTPVSRTT
 SSFSHSSPDATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTSQIT
 SSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPRTETSKTFPASTV
 FPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTTSSLFTLLVTGTSRVDL
 SPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLA
 TSSSAETSTSTLTLTVSPAUSGLSSASITTDKPQTVTSWNTETS
 PSVTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPPKTSHGEGVSPTT
 ILRTTMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNTLAGSLFTPLTTPGM
 STLASESVTSRTSYNHRWSWISTTSSYNRRYWTPATSTPVTSTF
 SPGISTSSIPSSTAATVPFMVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSR
 KFNATERELQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPEKDSSAT

5

10

15

20

AVDAICTHRPDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDR
 NSLYVNGFTHRSSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSPTTA
 GPLLMPFTLNFTITNLQYEEDMRRTGSRKFNTMESVLQGLLKP
 LFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSP
 GLNREQLYWELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVS
 TTSTPGTSTVDLRTSGTPSSLSSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNL
 QYGEDMGHPGSRKFNTTERVLQGLLGPIFKNTSVGPLYSGCR
 LTLRSEKDGAATGVDAICHHLDPKSPGLNRERLYWELSQLT
 NGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTSVPTSSTPGTSTVDLGTS
 GTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNLKYEEDMHRPGSRKFNT
 TERVLQTLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVD
 AICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSL
 YVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGSGTPSSLPSPTTAGPLL
 VFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTERVLQSLLGPMFKNT
 SVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDR
 EQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTST
 PGTSTVDLGTSCTPSSLPSPTSAGPLLVPFTLNFTITNLQYEED
 MHHPGSRKFNTTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLR
 PEKNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTNGIK
 ELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSCTP
 SSLPSPTTAVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPGSRKFNTTE
 RVLQGLLGPLFKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAIC
 THHLNPQSPGLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYV
 NGFTHRSSGLTTSTPWTSTVDLGTSCTPSPVPSPPTTGPLLV

5

10

15

20

FTLNFTITNLQYEENMGHPGSRKFNITESVLQGLLKPLFKSTSV
 GPLYSGCRLTLLRPEKDGVATRVDICTHRPDPKIPGLDRQQL
 YWELSQLTHSITELGPYTLDRDSLIVNGFTQRSSVPTTSTPGT
 FTVQPETSETPSSLPGPTATGPVLLPFTLNFTITNLQYEEDMR
 RPGSRKFNTTERVLQGLLMPLFKNTSVSSLYSGCRLTLLRPEK
 DGAATRVDVCTHRPDPKSPGLDRERLYWKLSQLTHGITELG
 PYTLDRHSLIVNGFTHQSSMTTTRTPDTSTMHLATSRTPASL
 SGPMTASPLLVLFTINFTITNLRYEENMHHPGSRKFNTTERVL
 QGLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPPKDGAATKVDAICTYR
 PDPKSPGLDREQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDSLIVNGFT
 QRSSVPTTSIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLLVLFTLNF
 TITNLRYEENMQHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFKSTSVGPLY
 SGCRLTLLRPEKDGTATGVDAICTHHPDPKSPRLDREQLYWE
 LSQLTHNITELGPYALDNDSLFVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTV
 YLGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGSR
 KFNTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGEAT
 GVDAICTHRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDR
 DSLIVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTINNLRYMADMG
 QPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVK
 NGAETRVDLLCTYLQPLSGPGLPIKQVFHELSSQTHGITRLGP
 YSLDKDSLILNGYNEPGPDEPPTTPKPATTFLPPLSEATTAMG
 YHLKTLTNFTISNLQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRPLF
 QKSSMGPFYLGQCQLISLRPEKDGAATGVDDTCTYHPDPVGP
 LDIQQLYWELSQLTHGVTQLGFYVLDRLSLFINGYAPQNLSIR

5			GEYQINFHIVNWNLSNPDPPTSSEYITLLRDIQDKVTTLYKGSQ HDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTL NASFHWLGSTYQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQHFYLNFTI TNLPYSQDKAQPGTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSD CQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CNFSPLARRVDRVAIYEEFLRM TRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPFWAVI LIGLAGLLGVITCLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYQS HLDLEDLQ
	14	Enlazador	DGGGS
10	15	Enlazador	TGEKP
	16	Enlazador	GGRR
	17	Enlazador	(GGGS) _n ; en donde n = 1, 2, 3, 4 o 5
	18	Enlazador	EGKSSGSGSESKVD
15	19	Enlazador	KESGSVSSEQLAQFRSLD
	20	Enlazador	GGRRGGGS
	21	Enlazador	LRQRDGERP
	22	Enlazador	LRQKDGGGSERP
	23	Enlazador	LRQKD(GGGS) ₂ ERP
20	24	Enlazador	GGGSGGGGSGGGGS
	25	Enlazador	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
	26	2A sitio de escisión	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
	27	2A sitio de escisión	TLNFDLLKLAGDVESNPGP

5	28	2A sitio de escisión	LLKLAGDVESNPGP
	29	2A sitio de escisión	NFDLLKLAGDVESNPGP
	30	2A sitio de escisión	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
	31	2A sitio de escisión	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
10	32	2A sitio de escisión	VTELLYRMKRAETYCPRLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
	33	2A sitio de escisión	LNFDLLKLAGDVESNPGP
	34	2A sitio de escisión	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
15	35	2A sitio de escisión	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
	36	Sitio de escisión	EXXYXQ(G/S)
20	37	Sitio de escisión	ENLYFQG
	38	Sitio de escisión	ENLYFQS
	39	ectodominio MUC16	PGSRKFNTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKD GEATGVDAICTHRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPY

5

10

15

20

NTSMTPLETSAPGEESEMTATLVPTLGFTTLDSKIRSPSQVSS
 SHPTRELRTTGSTSGRQSSSTA AHGSSDILRATTSSSTKASS
 WTSESTAQQFSEPQHTQWVETSPSMKTERPPASTSVAAPITT
 SVPSVVS GF TTKTSSTKGIWLEETSADTLIGESTAGPTTHQFA
 VPTGISMTGGSSTRGSQGTTHLLTRATASSETSADLT LATNGV
 PVS VSPA VSKTAAGSSPPGGTKPSYTMVSSVIPETSSLQSSAF
 REGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDSAGHTKISTSIPLLSSASVLE
 DKVSATSTF SHHKATSSITTGTPEISTKTKPSSAVLSSMTLSNA
 ATSPERVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTLSTSAETTDSPNI
 HPTGTLTSESSESPSTLSLPSVSGVKTTFSSSTPSTHLFTSGE
 ETEETSNPSVSQPETS VSRVRTTLASTSVPTPVFPTMDTWPT
 RSAQFSSSHLVSELRATSSTSVTNSTGSALPKISHLTGTATMS
 QTNRDTFNDSAAPQSTTWPETS PRFKTGLPSATTTVSTSATS
 LSATVMVSKFTSPATSSMEATSIREPSTTILTETTNGPGSMAV
 ASTNIPIGKGYITEGRLDTS HLPIGTTASSETSMDFTMAKESVS
 MSVSPSQSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVYHLTSREITIPR
 DGTSSALTPQMTATHPPSPDPGSARSTWL GILSSSPSSPTPK
 VTMSSTFSTQRVTTSMIMDTVETSRWNMPNLPSTTSLTPSNIP
 TSGAIGKSTLVPLDTPSPATSLEASEGGLPTLSTYPESTNTPSI
 HLG AHASSESPSTIKLTMASVVKPGSYTPLTFPSIETHIHVSTA
 RMAYSSGSSPEMTAPGETNTGSTWDPTTYITTTDPKDTSSAQ
 VSTPHSVRTLRTTENHPKTESATPAAYSGSPKISSSPNLTPA
 TKAWTITDTTEHSTQLHYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPT
 SPTIGSSTLELTSDVPGEPLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTE

5

10

15

20

EMASTDLDISSPSSPMSTFAIFPPMSTPSHELKSEADTSAIRN
 TDSTTLDQHLGIRSLGRTGDLTTPITPLTTTWTSVIEHSTQAAQ
 DTLSATMSPHTVTQSLKDQTSIPASASPSHLTEVYPELGTQGR
 SSSEATTFWKPSTD TLSREIETGPTNIQSTPPMDNTTGGSSSS
 GVTLGIAHLPIGTSSPAETSTNMALERRSSTATVSMAGTMGLL
 VTSAPGRSISQSLGRVSSVLSESTTEGVTDSSKGSSPRLNTQ
 GNTALSSSLEPSYAEGSQMSTSIPLTSSPTTPDVEFIGGSTFW
 TKEVTTVMTSDISKSSARTESSSATLMSTALGSTENTGKEKLR
 TASMDLPSPTPSMEVTPWISLTLSNAPNTTDSLDSLHGVHTSS
 AGTLATDRSLNTGVTRASRENGSDTSSKSLSMGNSTHTSMT
 YTEKSEVSSSIHPRPETSAPGAETTLTSTPGNRAISLTLPFSSIP
 VEEVISTGITSGPDINSAPMTHSPITPPTIVWTSTGTIEQSTQPL
 HAVSSEKVSQVQTQSTPYVNSVAVSASPHTENS SVSSGSSTSSP
 YSSASLES LDSTISR RNAITSWLWDLTTS LPTTTWPSTSLSEAL
 SSGHSGVSNPSSTTTEFPLFSAASTSAAKQRNPETETHGPQN
 TAASTLNTDASSVTGLSETPVGASISSEVPLPMAITSRSDVSGL
 TSESTANPSLGTASSAGTKLTRTISLPTSESLVSFRMNKDPWT
 VSIPLGSHPTTNTETSIPVNSAGPPGLSTVASDVIDTPSDGAES
 IPTVSFSPSPDTEVTTISHFPEKTTHSFRTISSLTHELTSRVTPIP
 GDWMSSAMSTKPTGASPSITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASFT
 ETSTVSLDNETTVKTS DILDARKTNELPSDSSSSSSDLINTSIASS
 TMDVTKTASISPTSISGMTASSSPSLFSSDRPQVPTSTTETNTA
 TSPSVSSNTYSLDGGSNVGGTPSTLPPFTITHPVETSSALLAW
 SRPVRTFSTMVSTD TASGENPTSSNSVVTSPAPGTWTSVGS

5

10

15

20

TTDLPAMGFLKTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPHLSAAVVTGS
 SATSEASLLTTSESKAIHSSPQTPTTPTSGANWETSATPESLLV
 VTETSDTTLTSKILVTDILFSTVSTPPSKFPSTGTLGASFPTL
 LPDTPAIPLTATEPTSSLATSFDSTPLVTIASDSLGTVPETTLTM
 SETSNGDALVLKTVSNPDRSIPGITIQGVTESPLHPSSTSPSKIV
 APRNTTYEGSITVALSTLPAGTTGSLVFSQSSENSETTALVDS
 SAGLERASVMPLTTGSQGMASGGIRSGSTHSTGKTFSSLP
 LTMNPGEVTAMSEITTNRLTATQSTAPKGIPVKPTSAESGLLTP
 VSASSSPSKAFASLTAPPTWGIPQSTLTFFEFSEVPSLDTKSA
 SLPTPGQSLNTIPDSDASTASSLSKSPEKNPRARMMTSTKAI
 SASSFQSTGFTETPEGSASPSMAGHEPRVPTSGTGDPRIAS
 EMSYPDPSKASSAMTSTSLASKLTTLFSTGQAARSGSSSSPI
 SLSTEKETSFLSPTASTSRKTSFLGPSMARQPNILVHLQTSAL
 TLSPTSTLNMSQEEPELTSSQTIAEEEGTTAETQTLTFTPSET
 PTSLLPVSSPTEPTARRKSSPETWASSISVPAKTSLVETTDGTL
 VTTIKMSSQAAQGNSTWPAPAEETGSSPAGTSPGSPPEMSTTL
 KIMSSKEPSISPEIRSTVRNSPWKTPETTVPMETTVEPVTLQST
 ALGSGSTSISHLPTGTTSPTKSPTENMLATERVSLSPSPPEAW
 TNLYSGTPGGTRQSLATMSSVSLESPTARSITGTGQQSSPEL
 VSKTTGMEFSMWHGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDPVTSPN
 SVSSLTDKSKHKTETWVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVD
 EAYSSTSSWSDQTS GSDITLGASPDVTNTLYITSTAQTTSVLVSL
 PSGDQGITSLTNPSSGGKTSSASSVTSPSIGLETLRANVSAVKS
 DIAPTAGHLSQTSSPAEVSILDVTTAPTGPISTTITTMGTNSIST

5

10

15

20

TTPNPEVGMSTMDSTPATERRTTSTHEPSTWSSTAASDSWT
 VTDMTSNLKVARSPGTISTMHTTSFLASSTELDSMSTPHGRIT
 VIGTSLVTPSSDASAVKTETSTSERLSPSDTTASTPISTFSRV
 QRMSISVPDILSTSWTPSSTEAEDVPVSMVSTDHASTKTDPN
 PLSTFLFDLSTLDWDTGRSLSSATATTAPQGATTPQELTLE
 TMISPATSQLPFSIGHITSAVTPAAMARSSGVTFSRPDPTSKKA
 EQTSTQLPTTTSAHPGQVPRSAATTLDVIPHTAKTPDATFQRQ
 GQTALTTEARATSDSWNEKEKSTPSAPWITEMMNSVSEDTIK
 EVTSSSSVLRTLNTLDINLESGTTSSPSWKSSPYERIAPSESTT
 DKEAIHPSTNTVETTGWVTSSEHASHSTIPAHSASSKLTSPVV
 TTSTREQAIVSMSTTTWPESTRARTEPNSTFLTIELRDVSPYMD
 TSSTTQTSIISSPGSTAITKGPRTEITSSKRISSSFLAQSMRSD
 SPSEAITRLSNFPAMTESGGMILAMQTSPPGATSLSAPTLDT
 ATASWTGTPLATTQRFTYSEKTTLFSKGPEDTSQPSPPSVEET
 SSSSSLVPIHATTSPSNILLTSQGHSPSSTPPVTSVFLSETSGL
 GKTTDMSRISLEPGTSLPPNLSSTAGEALSTYEASRDTKAIHH
 SADTAVTNMEATSSEYSPIPGHTKPSKATSPLVTSHIMGDITSS
 TSVFGSSETTEIETVSSVNQGLQERSTSQVASSATETSTVITHV
 SSGDATTHVTKTQATFSSGTSISSPHQFITSTNTFTDVSTNPST
 SLIMTESSGVTTITTQTGPTGAATQGPYLLDTSTMPYLTETPLAV
 TPDFMQSEKTTLISKGPKDVSWTSPPSVAETSYPPSSLTPFLVT
 TIPPATSTLQGQHTSSPVSATSVLTSGLVKTTDMLNTSMEPVT
 NSPQNLNNPSNEILATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGTASSAH
 VLHSTLPVSSEPSTATSPMVPASSMGDALASISIPGSETTDIEG

5

10

15

20

EPTSSLTAGRKENSTLQEMNSTTESNIILSNVSVGAITEATKME
 VPSFDATFIPTPAQSTKFPDIFSVASSRLSNPPMTISTHMTT
 QTGSSGATSKIPLALDTSTLETSAGTPSVTEGFAHSKITTAMN
 NDVKDVSQTNPPFQDEASSPSSQAPVLVTTLPSSVAFTPQWH
 STSSPVSMSSVLTSVLKTAGKVDTSLLETVTSSPQSMSNTLDD
 ISVTSAAATTDIETHPSINTVVTNVGTTGSAFESHSTVSAYPEP
 SKVTSPNVTTSTMEDTTISRSIPKSSKTTTRTETETTSSLTPKLR
 ETSISQEITSSSTETSTVPYKELTGATTEVSRTDVTSSSSTSFPG
 PDQSTVSLDISTETNTRLSTSPIMTESAEITITTQTGPHGATSQ
 DTFTMDPSNTPQAGIHSAMTHGFSQLDVTTLMSRIPQDVSW
 TSPPSVDKTSSPSSFLSSPAMTTPLISSTLPEDKLSSPMTSLL
 TSGLVKITDILRTRLEPVTSSLPNFSSTSDKILATSKDSKDTKEIF
 PSINTEETNVKANNSGHESHSPALADSETPKATTQMVIITTVG
 DPAPSTSMPVHGSSETTNIKREPTYFLTPRLRETSTSQESSFP
 TDTSFLLSKVPTGTITEVSSTGVNSSSKISTPDHDKSTVPPDTF
 TGEIPRVFTSSIKTKSAEMTITTQASPPEASASHSTLPLDTSTTLS
 QGGTHSTVTQGFYSEVTTLMGMGPGNVSWMTTPPVEETSS
 VSSLMSSPAMTSPSPVSSTSPQSIPSSPLPVTALPTSVLVTTTD
 VLGTTSPESVTSSPPNLSSITHERPATYKDTAHTAAMHHSTN
 TAVTNVGTSGSGHKSQSSVLADSETSKATPLMSTTSTLGDT
 VSTSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLRESSTSEKTSSTTETNTA
 FSYVPTGAIQASRTEISSRSTSISDLDRPTIAPDISTGMITRLFT
 SPIMTKSAEMTVTTQTTTPGATSQGILPWDSTTLFQGGTHST
 VSQGFPHSEITTLRSRTPGDVSWMTTPPVEETSSGFSLMSPS

5

10

15

20

MTSPSPVSSTSPESIPSSPLPVTALLTSVLVTTTNVLGTTSP
 VTSSPPNLSSPTQERLTTYKDTAHTTEAMHASMHTNTAVANVG
 TSISGHESQSSVPADSHTSKATSPMGITFAMGDTSVSTSTPAF
 FETRIQTESTSSLIPGLRDTRTSEEINTVTETSTVLSEVPTTTTT
 EVSRTEVITSSRTTISGPDHSMSPYISTETITRLSTFPFVTGST
 EMAITNQTGPIGTISQATLTLDTSSTASWEGTHSPVTQRFPHS
 EETTTMSRSTKGVSWQSPPSVEETSSPSSPVPLPAITSHSSLY
 SAVSGSSPTSALPVTSLTSGRRKTIDMLDTHSELVTSSLPSAS
 SFSGEILTSEASTNTETIHFSENTAETNMGTNNMHKLHSSVSI
 HSQPSGHTPPKVTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSP
 LTPELKEDSTALVMNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVYY
 DPTFMPASAQSTKSPDISPEASSSHSNPPLTISTHKTIATQTG
 PSGVTSLGQLTLDSTIATSAGTPSARTQDFVDSETTSVMNND
 LNDVLKTSPFSAEEANSLSSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTS
 SLVSVTSVPTPTLAKITDMDTNLEPVTRSPQNLNRNTLATSEATT
 DHTMHPSINTAVANVGTTSSPNEFYFTVSPDSDPYKATSAVV
 ITSTSGDSIVSTSMPRSSAMKKIESETTFSLIFRLRETSTSQKIG
 SSSDTSTVFDKAFTAATTEVSRTSLTSSSRTSIQGTEKPTMSP
 DTSTRSVTMLSTFAGLTKSEERTIATQTGPHRATSQGTLTWDT
 SITTSQAGTHSAMTHGFSQLDLSTLTSRVPEYISGTSPPSVEK
 TSSSSSLLSLPAITSPSPVPPTLPESRPSSPVHLTSLPTSGLVK
 TTDMLASVASLPNGLGSTSHKIPTTSEDIKDTEKMYPSTNIAVT
 NVGTTTSEKESYSSVPAYSEPPKVTSPMVTSFNIRDTIVSTSM
 PGSSEITRIEMESTFSLAHGLKGTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLT

5

10

15

20

TGATETSRTEVASSRRTSIPGPDHSTESPDISTEVIPSLPISLGI
 TESSNMTIITRTGPPLGSTSQGTFTLDTPTTSSRAGTHSMATQ
 EFPHSEMTTVMNKDPEILSWTIPPSIEKTSFSSSLMPSPAMTS
 PPVSSTLPKTIHTTTPSPMTSLLTPSLVMTTDTLGTSPPTTSSP
 PNLSSTSHEILTDEDTTAEAMHPSTSTAATNVETTSSGHGS
 QSSVLADSEKTKATAPMDTTSTMGHTTVSTSMSVSSETTKIKR
 ESTYSLTPGLRETSISQNASFSTDTSIVLSEVPTGTAEVSRTE
 VTSSGRTSIPGPSQSTVLPEISTRMTMLFASPTMTESAEMTIP
 TQTGPSGSTSQDTLTLDTSTTKSQAKTHSTLTQRFPHSEMTTL
 MSRGPGDMSWQSSPSLENPSSLPSLLSLPATTSPPPISSTLPV
 TISSSPLPVTSLLTSSPVTTTDMMLHTSPELVTSSPPKLSHTSDE
 RLTTGKDTTNTAEVHPSTNTAASNVEIPSSGHESPSSALADSE
 TSKATSPMFITSTQEDTTVAISTPHFLETSRIQKESISSLSPKLR
 ETGSSVETSSAIETSAVLSEVSGATTEISRTEVTSSSRTSISGS
 AESTMLPEISTTRKIIKFPTSPILAESSEMTIKTQTSPPGSTSEST
 FTLDTSTTPSLVITHSTMTQRLPHSEITTLVSRGAGDVPRPSSL
 PVEETSPSSQLSLSAMISPPVSSTLPASSHSSASVTSLTTP
 GQVKTTEVLDAEAPETSSPPSLSSTSVEILATSEVTTDTEKIH
 PFSNTAVTKVGTSSSGHESPSSVLPDSETTKATSAMGTISIMG
 DTSVSTLTPALSNTRKIQSEPASSLTTRLRETSTSEETSLATEA
 NTVLSKVSTGATTEVSRTEAISFSRTSMGPEQSTMSQDISIG
 TIPRISASSVLTESAKMTITTQTGPSESTLESTLNLNTATTPSWV
 ETHSIVIQQGFPHPEMTTSMGRGPGGVSWPSPPFVKETSPSS
 PLSLPAVTSPHPVSTTFLAHIPPSPLPVTSLLTSGPATTTDILGT

5

10

15

20

STEPGTSSSSSLSTTSHERLTTYKDTAHTAVHPSTNTGGTNV
 ATTSSGYKSQSSVLADSSPMCTTSTMGDTSVLTSTPAFLETR
 RIQTELASSLTPGLRESSGSEGTSSGTKMSTVLSKVPTGATTEI
 SKEDVTSIPGPAQSTISPDISTRVSWFSTSPVMTESAEITMNT
 HTSPLGATTQGTSTLDTSSTTSLTMTHSTISQGFSHSQMSTLM
 RRGPEDEVSWMSPPLEKTRPSFSLMSSPATTSPSPVSSTLPE
 SSSSPLPVTSLLTSGLAKTTDMLHKSSEPVTNSPANLSSTSVE
 ILATSEVTTDTEKTHPSSNRTVTDVGTSSSGHESTSFVLADSQ
 TSKVTSPMVITSTMEDTSVSTSTPGFFETSRIQTEPTSSLTLGL
 RKTSSSEGTSLATEMSTVLSGVPTGATAEVSRTTEVTSSSRTSI
 SGFAQLTVSPETSTETITRLPTSSIMTESAEMMIKTQTDPPGST
 PESTHTVDISTTPNWWETHSTVTQRFHSEM TTLVSRSPGDM
 LWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSPVSSTLVEDFPSASLP
 VTSLNPNGLVITTD RMGISREPGTSSTSNLSSTSHERLTTLEDT
 VDTEDMQPSTHTAVTNVRTSISGHESQSSVLSDSETPKATSP
 MGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIEPTSSLTSGLRETSSSE
 RISSATEGSTVLSEVPSGATTEVSRTEVISSRGTSMSGPDQFTI
 SPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGTLTLDTS
 TTTFWSGTHSTASPGFSHSEM TTLMSRTPGDVPWPSLPSVE
 EASSVSSSLSSPAMTSTSFFSTLPESISSSPHPVTALLTLGPVK
 TTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIHPSN
 TPVVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNTSVS
 TSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLSG
 MPTGATTKVS RTEALSLGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRISTP

5

10

15

20

LTTTGS AEMTITPKTGHSGASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSA
 ATHRSPHSGMTTPMSRGPEDVSWPSRPSVEKTSPSSSLVSL
 SAVTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKTTDMLDTSL
 EPVTTSPPSMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTI
 SARQEFYSSYPGLPEPSKVTSPVVTSSTIKDIVSTTIPASSEITRI
 EMESTSTLTPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPYKALTSATIEDSM
 TQVMSSSRGPSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTESTEMTIT
 TQTGSPGATSRGTLTLDSTTFMSGTHSTASQGFHSQMTAL
 MSRTPGDVPWLSHPSVEEASSASFSLSSPVMTSSSPVSSTLP
 DSIHSSSLPVTSLLTSGLVKTTTELLGTSSEPETSSPPNLSSTSA
 EILAITEVTTDTEKLEMTNVVTSGYTHESPSSVLADSVTTKATS
 SMGITYPTGDTNVLTSTPAFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSIS
 EETSSATEKSTVLSSVPTGATTEVSRTEAISSSRTSIPGPAQST
 MSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTGPSGATSQGTFTL
 DSSSTASWPGTHSATTQRFQSVVTTTPMSRGPEDVSWPSPL
 SVEKNSPSSSLVSSSSVTSPSPLYSTPSGSSHSSPVPVTSLFT
 SIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNITSDESLAASKATTETEAI
 HVFENTAASHVETTSATEELYSSSPGFSEPTKVISPVTSSSIR
 DNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPGLRETRTSQDITSSTET
 STVLYKMPSGATPEVSRTEVMPSSRTSIPGPAQSTMSLDISDE
 VVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQVTLPLGTSMTFLSG
 THSTMSQGLSHSEMTNLMSRGPESLSWTSPRFVETTRSSSSL
 TSLPLTTSLSPVSSSTLLDSSPSSPLPVTSLILPGLVKTTTEVLDT
 SEPKTSSSPNLSSTSVEIPATSEIMTDTEKIHPSSENTAVAKVRT

5

10

15

20

SSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITSADVDDTTVFTSNPAFSE
 TRRIPTPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSAVLYGVPTSATTE
 VSMTEIMSSNRIHIPDSDQSTMSPDIITEVITRLSSSSMMSEST
 QMTITTQKSSPGATAQSTLTATTTAPLARTHSTVPPRFLHSE
 MTTLMSPENPSWKSSLFVEKTSSSSSLLSLPVTTSPSVSST
 LPQSIPSSSFVTSLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPLNSGTSVE
 ILAASEVTTDTEKIHPSSSMAVTNVGTTSSGHELYSSVSIHSEP
 SKATYPVGTPSSMAETSISTSMANFETTGFEEPFSLTSGF
 RKTNMSLDTSSVTPTNTPSSPGSTHLLQSSKDTFTSSAKTSSP
 DWPPASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITSFPESRFTMSVTE
 STHHLSTDLLPSAETISTGTVMPSLSEAMTSFATTGVPRAISGS
 GSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVPFSSSTFTTTDSSTI
 PALHEITSSSATPYRVDTSLGTESSTTEGRLVMVSTLDTSSQP
 GRTSSSPILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRTDGIME
 HITKIPNEAAHRGTIRPVKGPQTSTSPASPKGLHTGGTKRMET
 TTTALKTTTTALKTTSRATLTTSVYTPTLGTLPNLSMMAST
 IPTEMMITTPYVFPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFN
 RESETTASLVSRGAERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAE
 TIPTVSKTTPNFFHSELDTVSSTATSHGADVSSAIPNISPSELD
 ALTPLVTISGTDSTTFPTLTKSPHETETRTTWLTHPAETSSTIP
 RTIPNFSHHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTS
 QVTSSGTDNRNMTIPTLTLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSSAIPTS
 TISPAVSRLVTSMTVSLAAKTSTTNRALTNSPGEPATTVSLVTH
 PAQTSPTVPWTTSIFFHSKSDTTSPMTTSHGAESSAVPTPTV

5

10

15

20

STEVPGVVTPLVTSSRAVISTTIPILTLSPGEPETTPSMATSHGE
 EASSAIPPTVSPGVPGVVTSLVTSSRAVTSTTIPILTFSLGEPE
 TTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMVTSLVASSRAVTSTTL
 PTLTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPTVSPEVPGVVTSLV
 TSSSGVNSTSIPTLILSPGELETTTPSMATSHGAEASSAVPTPTV
 SPGVSGVVTPLVTSSRAVTSTTIPILTLSSSEPETTPSMATSHG
 VEASSAVLTVSPEVPGMVTSLVTSSRAVTSTTIPTLTISSDEPE
 TTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPTVQGLVTSLVTSSGSETSAF
 SNLTVASSQPETIDSWVAHPGTEASSVPTLTVSTGEPFTNISL
 VTHPAESSSTLPRTTSRFSHSELDTMPSTVTSPEAESSAISTT
 ISPGIPGVLTSVTSSGRDISATFPTVPESPHESEATASWVTHP
 AVTSTTVPRTPPNYSHSEPDTTPSIATSPGAEATSDFPTITVSP
 DVPDMVTSQVTSSGTDTSITPTLTLSSGEPETTTSFITYSEHT
 SSAIPTLPVSPGASKMLTSLVISSGTDSTTTFPTLTETPYEPETT
 AIQLIHPAETNTMVPRTTPKFSSKSDTTLPVAITSPGPEASSA
 VSTTTISPDMSDLVTSLVPSSGTDSTTTFPTLSETPYEPETTAT
 WLTHPAETSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTSPGVDTRSGV
 PTTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGEPETTASSA
 THPGTQTGFTVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTSTPVSRTT
 SSFSSHPDATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTSQIT
 SSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPRTETSKTFPASTV
 FPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTTSSLFTLLVTGTSRVDL
 SPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLA
 TSSSAETSTSTLTLTVSPAUSGLSSASITTDKPQTVTSWNTETS

5

10

15

20

PSVTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPPKTSHGEGVSPTT
 ILRTTMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNTLAGSLFTPLTTPGM
 STLASESVTSRTSYNHRSWISTTSSYNRRYWTPATSTPVTSTF
 SPGISTSSIPSSTAATVPFMVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSR
 KFNATERELQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPEKDSSAT
 AVDAICTHRPDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDR
 NSLYVNGFTHRSSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSPTTA
 GPLLMPTLNFTITNLQYEEDMRRTGSRKFNTMESVLQGLLKP
 LFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSP
 GLNREQLYWELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVS
 TTSTPGTSTVDLRTSGTPSSLSSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNL
 QYGEDMGHPGSRKFNTTERVLQGLLGPIFKNTSVGPLYSGCR
 LTLRSEKDGAATGVDAICHHLDPKSPGLNRERLYWELSQLT
 NGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTSVPTSSTPGTSTVDLGTS
 GTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNLKYEEDMHRPGSRKFNT
 TERVLQTLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVD
 AICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSL
 YVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGSGTPSSLPSPTTAGPLL
 PFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTERVLQSLLGPMFKNT
 SVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDR
 EQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTST
 PGTSTVDLGTSCTPSSLPSPTSAGPLLVPFTLNFTITNLQYEED
 MHHPGSRKFNTTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLR
 PEKNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIK

5

10

15

20

		ELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTP SSLPSPTTAVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPGSRKFNTTE RVLQGLLGPLFKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAIC THHLNPQSPGLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYV NGFTHRSSGLTTSTPWTSTVDLGTSGTPSPVPSPPTTGPLLVP FTLNFTITNLQYEENMGHPGSRKFNITESVLQGLLKPLFKSTSV GPLYSGCRLTLLRPEKDGVATRVDICTHRPDPKIPGLDRQQL YWELSQLTHSITEELGPYTLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGT FTVQPETSETPSSLPGPTATGPVLLPFTLNFTITNLQYEEDMR RPGSRKFNTTERVLQGLLMPLFKNTSVSSLYSGCRLTLLRPEK DGAATRVDVCTHRPDPKSPGLDRERLYWKLSQLTHGITELG PYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTTRTPDTSTMHLATSRTPASL SGPMTASPLLVLFTINFTITNLRYEENMHHPGSRKFNTTERVL QGLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPKKDGAATKVDAICTYR PDPKSPGLDREQLYWELSQLTHSITEELGPYTLDRDSLYVNGFT QRSSVPTTSIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLLVLFTLNF TITNLRYEENMQHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFKSTSVGPLY SGCRLTLLRPEKDGTATGVDAICTHHPDPKSPRLDREQLYWE LSQLTHNITELGPYALDNDSLFVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTV YLGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMW
41	Anti-MUC16 7135 CDRL1	QSISSY
42	Anti-MUC16	AAS

	7135 CDRL2	
5	43 Anti-MUC16 7135 CDRL3	QQSYSTPPIT
	44 Anti-MUC16 7135 CDRH1	GFTFSYHE
10	45 Anti-MUC16 7135 CDRH2	IGSRGTTK
	46 Anti-MUC16 7135 CDRH3	ASEVGSILGYSDV
15	47 Cadena ligera variable Anti- MUC16 7135	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK
20	48 Cadena pesada variable Anti- MUC16 7135	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSYHEMNWVRQAP GKGLEWVSYIGSRGTTKHYADPVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCASEVGSILGYSDVWGQGTTVTVSS
	49 pBB4000 secuencia	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSYHEMNWVRQAP GKGLEWVSYIGSRGTTKHYADPVKGRFTISRDNKNSLYLQM

51	pBB4001 secuencia de CAR a.a. sin péptido señal	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSYHEMNWVRQAPGKGL EWVSYIGSRGTTKHYADPVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCASEVGSILGYSDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
52	pBB4001 secuencia de CAR a.a. con péptido señal	MALPVTALLPLALLHAARPD IQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG FTFSYHEMNWVRQAPGKGLEWVSYIGSRGTTKHYADPVKGR FTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASEVGSILGYSDV WGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHD

5 <
--

5	60 Cadena pesada variable Anti- MUC16 7138	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSDINWVRQAT GQGLEWVGWMNPNYGYTGSARKFQDRVTMTRNTSLSTAYL ELHSLRSED TAVYYCARVTYCSSVTSCFRPFTYWGQGLVTV SA
10	61 pBB4002 secuencia CAR a.a. sin péptido señal	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSDINWVRQAT GQGLEWVGWMNPNYGYTGSARKFQDRVTMTRNTSLSTAYL ELHSLRSED TAVYYCARVTYCSSVTSCFRPFTYWGQGLVTV SAGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR
20	62 pBB4002 secuencia CAR a.a. con péptido señal	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSSDINWVRQATGQGLEWVGWMNPNYGYTGSAR KFQDRVTMTRNTSLSTAYLELHSLRSED TAVYYCARVTYCSS VTSCFRPFTYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ

5		SYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELR VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10	63	pBB4003 secuencia CAR a.a. sin péptido señal
15		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSDINWVRQATGQGL EWVGWMNPNGYTGSAKRFQDRVMTNRNTSLSTAYLELHSL RSEDVAVYYCARVTYCSSVTSCFRPFTYWGQGLVTVSATT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR
20	64	pBB4003 secuencia de CAR a.a. con péptido señal
		MALPVTALLLPLALLHAARPDQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKG GGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG

5			YTFTSSDINWVRQATGQGLEWVGWMNPNYGYTGSARKFQD RVTMTRNTSLSTAYLELHSLRSEDTAVYYCARVTYCSSVTSCF RPFTYWGQGTTLTVSATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10	65	Anti-MUC16 8755 CDRL1	QSINIY
15	66	Anti-MUC16 8755 CDRL2	AAS
	67	Anti-MUC16 8755 CDRL3	QHSYSTPPIT
20	68	Anti-MUC16 8755 CDRH1	GFTFNDYA
	69	Anti-MUC16 8755 CDRH2	IDWNGGSI

5	70	Anti-MUC16 8755 CDRH3	AKDIGHWNYYIGGMDV
	71	Cadena ligera variable Anti- MUC16 8755	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINIYLNWYQQKPGKA PKFLIYAASSLQTVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYY CQHSYSTPPITFGQGTRLEIK
	72	Cadena pesada variable Anti- MUC16 8755	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSP GKGLEWVSGIDWNGGSDYADSVKGRFTISRDTAKNSLYLQM NSLKVEDTALYYCAKDIGHWNYYIGGMDVWGQGTTVTVSS
10	73	pBB4004 secuencia de CAR a.a. sin péptido señal	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSP GKGLEWVSGIDWNGGSDYADSVKGRFTISRDTAKNSLYLQM NSLKVEDTALYYCAKDIGHWNYYIGGMDVWGQGTTVTVSSGG GGSGGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI NIYLNWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQTVPSRFSGSGSGTDFT LTISSELPEDFATYYCQHSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
15			
20			

74 5 10	pBB4004 secuencia de CAR a.a. con péptido señal	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSC AASGFTFNDYAMHWVRQSPGKGLEWVSGIDWNGGSIDYADS VKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLKVEDTALYYCAKDIGHWNYI GGMDVWGQGTTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRVITICRASQSINIYLNWYQQKPGKAPKFLIYAAS SLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCQHSYSTP PITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
75 15 20	pBB4005 secuencia de CAR a.a. sin péptido señal	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSINIYLNWYQQKPGKA PKFLIYAASSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYY CQHSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSPGKGLE WVSGIDWNGGSIDYADSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLKV EDTALYYCAKDIGHWNYIGGMDVWGQGTTTVTSSTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ

		ALPPR
5	76	pBB4005
		secuencia de
		CAR a.a. con
		péptido señal
10		MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
		RASQSINIYLNWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQTGVPSRFSGSG
		SGTDFTLTISSELPEDFATYYCQHSYSTPPITFGQGTRLEIKGG
		GGSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGF
		TFNDYAMHWVRQSPGKGLEWVSGIDWNGGSIDYADSVKGRF
		TISRDTAKNSLYLQMNSLKVEDTALYYCAKDIGHWNYIGGMDV
		WGQGTITVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
		GGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKK
		LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSR
		SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
15		GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
		GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
	77	Anti-MUC16
		8767 CDRL1
		QSISTY
20	78	Anti-MUC16
		8767 CDRL2
		TAS
	79	Anti-MUC16
		8767 CDRL3
		QQSYSTPPIT

5	80	Anti-MUC16 8767 CDRH1	GFTFSNAA
	81	Anti-MUC16 8767 CDRH2	ISGRGSTI
	82	Anti-MUC16 8767 CDRH3	VKDRGGYSPY
10	83	Cadena ligera variable Anti- MUC16 8767	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKA PKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSYSTPPITFGQGTRLEIK
15	84	Cadena pesada variable Anti- MUC16 8767	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAP GKGLEWISYISGRGSTIFYADSVKGRITISRDNAKNSLFLQMNS LRAEDTAVYFCVKDRGGYSPYWGQGTTLTVSS
20	85	pBB4006 secuencia CAR a.a. sin péptido señal	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAP GKGLEWISYISGRGSTIFYADSVKGRITISRDNAKNSLFLQMNS LRAEDTAVYFCVKDRGGYSPYWGQGTTLTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNW YQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC

5		GVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
10	86	pBB4006 secuencia de CAR a.a. con péptido señal
15		MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC AASGFTFSNYMSWVRQAPGKGLEWISYISGRGSTIFYADSV KGRITISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKDRGGYSPY WGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVITICRASQSISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFG QGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
20	87	pBB4007 secuencia CAR a.a. sin péptido señal
		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISTYLNWYQQKPGKA PKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYMSWVRQAPGKGLE WISYISGRGSTIFYADSVKGRITISRDNAKNSLFLQMNSLRAED

5		TAVYFCVKDRGGYSPYWGQGT LVTVSSTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10	88	pBB4007 secuencia de CAR a.a. con péptido señal
15		MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITC RASQSISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGG GGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSNYYMSWVRQAPGKGLEWISYISGRGSTIFYADSVKGRITI SRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKDRGGYSPYWGQGT LVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR
20	89	Anti-MUC16 8794 CDRL1
		QSINSY
	90	Anti-MUC16
		AAS

	8794 CDRL2	
5	91 Anti-MUC16 8794 CDRL3	QQSYSSPPIT
	92 Anti-MUC16 8794 CDRH1	GFTFRDYS
10	93 Anti-MUC16 8794 CDRH2	VTFNSAI
	94 Anti-MUC16 8794 CDRH3	AREREPIVGGFDY
15	95 Cadena ligera variable Anti- MUC16 8794	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQGGVPSRFSGGSGTDFTLTITSLQPEDFATF YCQQSYSSPPITFGQGTRLEIK
20	96 Cadena pesada variable Anti- MUC16 8794	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWIRQAP GKGLEWVSYPVTFNSAIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREREPIVGGFDYWGQGTLVTVSS
	97 pBB4008 secuencia	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWIRQAP GKGLEWVSYPVTFNSAIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN

5	CAR a.a. sin péptido señal	SLRAEDTAVYYCAREREPIVGGFDYWGQGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQGGVPSRFSGGGSGTDFTLTI TSLQPEDFATFYCQQSYSSPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
15 20	98 pBB4008 secuencia CAR a.a. con péptido señal	MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC AASGFTFRDYSMSWIRQAPGKGLEWVS YVTFFNSAIYYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREREPIVGGF DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQSINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ GGVPSRFSGGGSGTDFTLTITSLQPEDFATFYCQQSYSSPPIT FGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5 10	99 pBB4009 CAR a.a. sequence without signal peptide	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQGGVPSRFSGGSGTDFTLTITSLQPEDFATF YCQQSYSSPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWIRQAPGKGL EWVSYVTFFNSAIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREREPIVGGFDYWGGQGLTVTSSTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
15 20	100 pBB4009 secuencia CAR a.a. con péptido señal	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQGGVPSRFSGG GGSGTDFTLTITSLQPEDFATFYCQQSYSSPPITFGQGTRLEIKG GGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFRDYSMSWIRQAPGKGLEWVSYVTFFNSAIYYADSVKGRF TISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREREPIVGGFDYW GQGTLTVTSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL

		YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
5	101	Anti-MUC16 8799 CDRL1
	102	Anti-MUC16 8799 CDRL2
10	103	Anti-MUC16 8799 CDRL3
	104	Anti-MUC16 8799 CDRH1
15	105	Anti-MUC16 8799 CDRH2
	106	Anti-MUC16 8799 CDRH3
20	107	Cadena ligera variable Anti- MUC16 8799
		EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSITSSYLAWYQQRPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

5	108 Cadena pesada variable Anti- MUC16 8799	EVQLVESGGGLEQPGRSLRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAP GKGLEWVGFIRSRAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQ MDSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYHGMDVWGRGTTV TVSS
10	109 pBB4010 Secuencia de CAR a.a. sin péptido señal	EVQLVESGGGLEQPGRSLRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAP GKGLEWVGFIRSRAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQ MDSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYHGMDVWGRGTTV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSITSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
20	110 pBB4010 secuencia CAR a.a. con péptido señal	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLEQPGRSLRLSC TASGFAFGDHTMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSRAYGGTTEYA ASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMDSLKTEDTAVYYCTSGGYDSS LHYYYYYHGMDVWGRGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEI VLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSITSSYLAWYQQRPGQA PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY

5		CQQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10	111 pBB4011 Secuencia de CAR a.a. sin péptido señal	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSITSSYLAWYQQRPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLEQPGRSLRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAPGKGL EWVGFIRSRAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMDSL KTEDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYYHGMDVWGRGTTVTVSS TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
15		
20	112 pBB4011 secuencia CAR a.a. con péptido señal	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC RASQSITSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLEQPGRSLRLSCTAS

5			GFAFGDHTMSWVRQAPGKGLEWVGFI RSRAYGGTTEYAASV KGRFTISRDDSKSIAYLQMDSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSLHY YYYHGM DVWGRGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10	113	Anti-MUC16 8804 CDRL1	QTVSSSY
15	114	Anti-MUC16 8804 CDRL2	GAS
	115	Anti-MUC16 8804 CDRL3	QQYGSSPWT
20	116	Anti-MUC16 8804 CDRH1	GLTFGDYG
	117	Anti-MUC16 8804 CDRH2	IHBKGYGGTT

5	118	Anti-MUC16 8804 CDRH3	TSGGYDSSVHYAAY
	119	Cadena ligera variable Anti- MUC16 8804	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
	120	Cadena pesada variable Anti- MUC16 8804	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGLTFGDYGMSWVRQAP GKGLEWVGFIRSKGYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSTAYL QMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYYAMDVWGQGT VTVSS
10	121	pBB4012 Secuencia de CAR a.a. sin péptido señal	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGLTFGDYGMSWVRQAP GKGLEWVGFIRSKGYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSTAYL QMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYYAMDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPGERATL SCRASQTVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKV EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR
15			
20			

5	122	pBB4012 secuencia CAR a.a. con péptido señal
10		MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSC TGSGLTFGDYGMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKGYGGTTEYA ASVKGRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDS SVHYYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
15	123	Secuencia de pBB4013 CAR a.a. sin péptido señal
20		EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGLTFGDYGMSWVRQAPGK GLEWVGFIRSKGYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSTAYLQM NSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYYAMDVWGQGTTVT VSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ

		EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR
5	124	pBB4013
	secuencia	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPGTLSPGERATLSC
	CAR a.a. con	RASQTVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG
	péptido señal	SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
		GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGS
		GLTFGDYGMSWVRQAPGKGLEWVGFIIRSKGYGGTTEYAASV
10		KGRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVH
		YYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL
		RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT
		LYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGG
		CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
15		RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
		RRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
	125	pBB4014
	secuencia	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGIHWVRQAP
	CAR a.a. sin	GKGLEWVAVISDDGSFKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
	péptido señal	NSLRVEDSAVYHCAKWQHNWNDGGFDYWGGTLTVSSGG
		GGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSL
20		SSNYLAWYRQKPGQAPRLLIYGISSRATGIPDRFSGSGSGTDF
		TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPR
		PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
		PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE

5			DGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
10	126 pBB4014 secuencia de CAR a.a. con péptido señal		MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC VASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVAVISDDGSFKFYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDSAVYHCAKWQHNWND GGFDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPD TSLSPGERATLSCRASQSLSSNYLAWYRQKPGQAPRLLIYGI SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS PWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
15			
20	127 Anti-MUC16 8810 CDRL1		QSVSNRY
	128 Anti-MUC16 8810 CDRL2		GAS

5	129	Anti-MUC16 8810 CDRL3	HQYGSSPWT
	130	Anti-MUC16 8810 CDRH1	GFTFSSYA
	131	Anti-MUC16 8810 CDRH2	ISYNGGTT
10	132	Anti-MUC16 8810 CDRH3	ARAAAP
15	133	Cadena ligera variable Anti- MUC16 8810	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIK
	134	Cadena pesada variable Anti- MUC16 8810	EVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEFVSTISYNGGTTYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRM GSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQGTTLTVSS
20	135	pBB4016 secuencia CAR a.a. sin péptido señal	EVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEFVSTISYNGGTTYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRM GSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWY

5		QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10	136	pBB4016 secuencia de CAR a.a. con péptido señal MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGALVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEFVSTISYNGGTTYADSV KGRFTVSRDNSKNTVFLRMGSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGER ATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPWTFGQG TKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
15		
20	137	pBB4017 secuencia CAR a.a. sin EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQ

5		péptido señal	LVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKG LEFVSTISYNGGTTYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRMGSLR TEDMAVYYCARAAAPWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10	138	pBB4017 secuencia de CAR a.a. con péptido señal	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSC RASQSVSNRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG SGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIK GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEFVSTISYNGGTTYADSVKGR FTVSRDNSKNTVFLRMGSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQGT LTVSSTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
15			
20	139	Anti-MUC16 8813 CDRL1	QSVSSSY

5			
	140	Anti-MUC16 8813 CDRL2	GAS
	141	Anti-MUC16 8813 CDRL3	QQYGSSPWT
10	142	Anti-MUC16 8813 CDRH1	GYTLTGYY
	143	Anti-MUC16 8813 CDRH2	INPNNGGT
15	144	Anti-MUC16 8813 CDRH3	ARSLELLPDGMDV
	145	Cadena ligera variable Anti-MUC16 8813	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
20	146	Cadena pesada variable Anti-MUC16 8813	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAFGYTLTGYYIHWVRQAP GQGLEWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARSLELLPDGMDVWGQGTTVTVSS

5 10	147 Secuencia de pBB4018 CAR a.a. sin péptido señal	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAFGYTLTGYYIHWVRQAP GQGLEWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARSLELLPDGMDVWGQGTTTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
15 20	148 pBB4018 secuencia CAR a.a. con péptido señal	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KAFGYTLTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNNGGTNYAQK FQGRVTMTRDKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARSLELLPD GMDVWGQGTTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGT LSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS PWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGH

		DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
5	149	pBB4019
	secuencia	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG
	CAR a.a. sin	QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV
	péptido señal	YYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV
		QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAFGYTLTGYYIHWVRQAPGQ
		GLEWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYMELS
		RLRSDDTAVYYCARSLELLPDGMDVWGQGTTVTVSSTTTPAP
10		RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW
		APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE
		EDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE
		LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
15		DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
		MQALPPR
20	150	pBB4019
	secuencia	MALPVTALLPLALLLHAARPEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC
	CAR a.a. con	RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG
	péptido señal	SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
		GGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAF
		GYTLTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNNGGTNYAQKFQ
		GRVTMTRDKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARSLELLPDGM
		DVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
		AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK
		KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS

		RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
5	151	ectodominio MUC16 humano ("nub")
10		PGSRKFNTTERTVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKD GEATGVDAICTHRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPY TLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTINNLRYM ADMGQPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIAL RSVKNGAETRVDLLCTYLQPLSGPGLPIKQVFHELSSQQTHGIT RLGPYSLDKDSLYLNGYNEPGPDEPPTTPKPATTFLPPLSEAT TAMGYHLKTLTNFTISNLQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLL RPLFQKSSMGPFFYLGCQLISLRPEKDGAATGVDTTCTYHPDP VGPGLDIQQLYWELSQLTHGVTQLGFYVLDNRDSLFINGYAPQ NLSIRGEYQINFHIVNWNLSNPDPSTSEYITLLRDIQDKVTTLYK GSQLHDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFL DKTLNASFHWLGSTYQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQHFY LNFTITNLPYSQDKAQPGTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKS YFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CNFSPLARRVDRVAIYEE FLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP
15		
20	152	Péptido señal de CD8
	153	Región de bisagra CD8
	154	Región
		MALPVTALLLPLALLLHAARP TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

	transmembrana CD8	
	Cola/enlazador	LYC
5	155	Región coestimuladora de 4-1BB
		KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
10	156	Región de señalización de CD3
		RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

15

20