

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA TRANSDUCCIÓN DE GENES Y PARA CONTROLAR LA ACTIVIDAD DE RECEPTORES SINTÉTICOS E INMUNITARIOS

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

[0001] La solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense N.º 63/478.612, presentada el 5 de enero de 2023, cuyas divulgaciones se incorporan íntegramente al presente documento por referencia.

CAMPO TÉCNICO

[0002] La presente divulgación está relacionada con el campo de la biotecnología y, más concretamente, con los receptores de antígenos sintéticos de cadena simple y multicadena.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DE LA LISTA DE SECUENCIAS

[0003] La presente solicitud incluye un listado de secuencias presentado electrónicamente junto con la misma en formato de archivo XLM, que se incorpora íntegramente al presente documento por referencia. El archivo XLM se creó el 5 de enero de 2024, se denominó "NKSAR-13.xlm" y tiene un tamaño de 99,899 megabytes.

ANTECEDENTES

[0004] Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) son receptores sintéticos que pueden redirigir las células T para destruir selectivamente las células tumorales. Para superar algunas de las limitaciones de diseño de los CAR convencionales de 2.^a generación, se han descrito varios diseños alternativos, denominados colectivamente CAR de próxima generación, incluidos Ab-TCR (WO 2017/070608 A1 incorporado en su totalidad en el presente documento como referencia), proteínas de fusión de receptores TCR (TFP) (WO 2016/187349 A1 incorporados en su totalidad en el presente documento como referencia), Receptores inmunitarios sintéticos (SIR) (WO 2018/102795 A1, incorporados en su totalidad en el presente documento como referencia), Acoplador de antígenos de células T trifuncionales (Tri-TAC) (WO 2015/117229 A1, incorporados íntegramente en el presente documento como referencia) y receptores sintéticos de antígenos (SAR), incluido el TCR-SAR universal (uTCR-SAR) (PCT/US22/17177, incorporado íntegramente en el presente documento como referencia). El STAR (WO2020029774, incorporado íntegramente aquí por referencia) y el TCR independiente de HLA (HIT) (WO201915745 A1, incorporado íntegramente aquí por referencia) tienen un diseño similar a la plataforma SIR. Estos diseños alternativos de CAR, en general, carecen de un dominio coestimulador. La presente divulgación describe nuevos receptores sintéticos de antígenos (SAR), nuevos dominios de unión a antígenos, nuevas envolturas virales y enfoques *in vivo* para la fabricación de SAR.

RESUMEN

[0005] La divulgación proporciona diseños de receptores de antígenos sintéticos (SAR) uniespecíficos, biespecíficos, multiespecíficos y universales. El término SAR se refiere a cualquier receptor de unión a antígeno no nativo que se expresa en la superficie de una célula (*p.ej.*, una célula inmunitaria). En una realización, un SAR comprende una única cadena polipeptídica. En una realización, un SAR comprende más de una cadena polipeptídica. En una realización, el SAR comprende dos cadenas polipeptídicas. La divulgación también proporciona nuevos módulos accesorios que comprenden coreceptores (*p.ej.*, CD8a, CD8b y CD4) que pueden coexpresarse con los SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR, HC-SAR, zSIR, zCD16-SAR, etc.) de la divulgación. Se proporcionan ejemplos de coreceptores coestimuladores en (SEQ ID NO (DNA): 644-646 y SEQ ID NO (PRT): 9024-9026).

[0006] La divulgación proporciona un método de producción de una célula que expresa uno o más de los módulos accesorios con uno o más de los SAR de la divulgación.

[0007] La divulgación proporciona un diseño novedoso de SAR uniespecíficos, biespecíficos y multiespecíficos (*p.ej.*, SIR, Ab-TCR, etc.) que comprenden una o más cadenas constantes TCR híbridas o variantes funcionales de las mismas, incluyendo variantes de especies no humanas (*p.ej.*, ratón, gato, perro, mono, etc.). En los SEQ ID NO (DNA) se proporcionan ejemplos de cadenas constantes TCR híbridas: 529-544, 21350-21814, 22794-23019, 23021-23070, 23072-23231, 23901-27920, y SEQ ID NO (PRT): 8909-8924, 22112-22576, 23420-23677, 27936-31955. La divulgación también proporciona que el SIR puede construirse usando cadenas constantes de TCR que codifican para polipéptidos con al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de aminoácidos con las cadenas constantes de TCR híbridas que se proporcionan en los SEQ ID NO (PRT): 8909-8924, 22112-22576, 23420-23677, 27936-31955. La divulgación también proporciona cadenas constantes de TCR híbridas que codifican para polipéptidos con deleciones N-terminales de entre 1 y 100 aminoácidos de las cadenas constantes de TCR con SEQ ID NO (PRT): 8909-8924, 22112-22576, 23420-23677, 27936-31955. La divulgación también proporciona que el SIR puede construirse usando cadenas constantes de TCR que son variantes y fragmentos funcionales (incluyendo mutantes de deleción) de las cadenas constantes de TCR híbridas que se proporcionan en SEQ ID NO (PRT): 8909-8924, 22112-22576, 23420-23677, 27936-31955, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, las cadenas TCR híbridas están optimizadas para codón, opcionalmente optimizadas para codón humano. En algunas realizaciones, las cadenas TCR híbridas comprenden mutaciones de cisteína en residuos específicos que dan lugar a la formación de un (segundo) enlace disulfuro adicional entre las cadenas TCR complementarias. En algunas realizaciones, las cadenas TCR híbridas comprenden mutaciones en las que los residuos de aminoácidos humanos se sustituyen por los aminoácidos correspondientes de una

especie no humana, como las cadenas TCR de ratón. En alguna realización, el SAR comprende una región constante de cadena α ($C\alpha$) de receptor de células T híbrido y una región constante de cadena beta ($C\beta$) de receptor de células T híbrido, en la que la región $C\alpha$ comprende mutaciones en las posiciones-aminoácidos 10C, 15C, 21F, 32I, 45C, 48C, 61R, 72T, 91S, 92D, 93V, 94P, 95R, 95S, 116L, 119V, 120L y cualquier combinación de las mismas correspondientes a una cadena $C\alpha$ de referencia representada por SEQ ID NO: 8833, y la región $C\beta$ comprende mutaciones en las posiciones-aminoácidos 15C, 17C, 18K o R, 22A, 23R, 39P, 54D, 57C, 59C, 77C, 79G, 131G, 131S, 133I, 136A, 139H y cualquier combinación de las mismas correspondientes a cadenas $C\beta$ de referencia representadas por SEQ ID NO: 8847 y 8848. En una realización, ambas cadenas de un SAR de doble cadena (*p.ej.*, un SIR, Ab-TCR, HIT, STAR, zSIR, zSAR, zCD16-SAR, etc.) o un SAR de cadena y media (*p.ej.*, un SIR, Ab-TCR, HIT o STAR, etc.) comprenden cadenas TCR híbridas. En una realización, una de las dos cadenas de un SAR de cadena doble o un SAR de cadena y media (OHC) comprende una cadena constante TCR híbrida y la segunda cadena del SAR de cadena doble o un SAR de cadena y media (OHC) comprende una cadena constante TCR no híbrida. En una realización, al menos una cadena de un SAR de cadena doble o un OHC comprende una cadena constante de TCR híbrida. En una realización, al menos una cadena de un SAR de doble cadena o un OHC comprende una cadena constante de TCR híbrida que lleva modificaciones adicionales, en las que las modificaciones se seleccionan opcionalmente entre delecciones, sustituciones y/o mutaciones de uno o más aminoácidos. En las **Tablas 16-20** de la solicitud provisional se proporcionan ejemplos de SAR de doble cadena y de cadena y media (*p.ej.*, SIR) con cadenas constantes de TCR híbridas. El genoma humano comprende dos cadenas constantes TCR β altamente homólogas: $C\beta 1$ y $C\beta 2$. Aunque, la mayoría de las secuencias de cadenas $C\beta$ (*p.ej.*, SAR, cadena TCR híbrida y fragmentos de las mismas) en la presente solicitud se basan en la secuencia de la cadena $C\beta 2$, una persona con las habilidades ordinarias en la técnica reconocerá que estas secuencias pueden sustituirse por las secuencias correspondientes basadas en la cadena $C\beta 1$.

[0008] Las células CAR-T de 2ª generación de uso clínico actual se asocian a varias toxicidades, como el síndrome de liberación de citoquinas (CRS), complicaciones neurológicas asociadas a células efectoras inmunitarias (ICAN), complicaciones neurológicas no asociadas a ICAN y cánceres secundarios. Varias de estas complicaciones están relacionadas con la señalización tónica a través de la construcción CAR, que da lugar a una proliferación de células CAR-T independiente del antígeno. En alguna realización, la divulgación proporciona que un SAR con cadenas TCR híbridas muestra menos señalización tónica y proliferación independiente del antígeno en comparación con un CAR de 2ª generación. También se ha

demostrado que las células CAR-T reconocen antígenos de bajo nivel expresados en tejidos sanos normales. Esto da lugar a toxicidad en el objetivo fuera del tumor. Para superar este problema, se han descrito construcciones CAR-T de afinidad modificada que utilizan dominios de unión a antígenos (*p.ej.*, scFvs, vHH) con menor afinidad. Sin embargo, el ajuste de afinidad de un dominio de unión a antígeno es un proceso costoso y que requiere mucho tiempo. También puede conducir a la pérdida de afinidad o a la adquisición de propiedades de unión nuevas e inesperadas para el dominio de unión a antígeno. Para superar esta limitación, la divulgación proporciona un método sencillo para generar un panel diverso de SAR con afinidad variable mediante el uso de diferentes cadenas de señalización. En una realización, la divulgación proporciona que las cadenas TCR híbridas y/o mutantes de la divulgación pueden utilizarse para generar rápidamente un panel diverso de SAR (*p.ej.*, un SIR, Ab-TCR, HIT, STAR, zSIR, zSAR, zCD16-SAR, etc.) construcciones de afinidades variables que comprenden el mismo dominio de unión a antígeno. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un método sencillo para la generación de un panel diverso de construcciones SAR afinadas y mejoradas en afinidad con diferentes afinidades que se basan en el mismo dominio de unión a antígeno (*p.ej.*, vL, vH, scFv, Fv, vHH, etc.). Así, el método de la divulgación supera las limitaciones y el riesgo asociados con la mutagénesis del dominio de unión a antígeno para generar un panel diverso de construcciones SAR y CAR afinadas y/o mejoradas en afinidad. La diversidad del conjunto de SAR se incrementa aún más por el uso de diferentes uniones en las cadenas híbridas y por el uso de diferentes enlazadores que pueden estar presentes entre los diferentes dominios de un SAR (*p.ej.*, dominio de unión a antígeno y dominio constante de TCR). La diversidad de células T que expresan el conjunto puede aumentarse aún más mediante el uso de diferentes módulos accesorios y controles terapéuticos descritos en la divulgación.

[0009] Este conjunto diverso de SAR puede utilizarse para proporcionar una respuesta inmunitaria diversa contra las células causantes o asociadas a la enfermedad que expresan dicho antígeno. Alternativamente, el conjunto diverso de SAR puede opcionalmente codificarse con barras de ADN utilizando técnicas conocidas en la técnica y utilizarse posteriormente para seleccionar un único o un subgrupo de SAR con características biológicas y clínicas óptimas. Estas características pueden incluir, entre otras, el rendimiento en los ensayos biológicos *in vitro* (*p.ej.*, citotoxicidad, secreción de citocinas, afinidad de unión, expresión de la superficie celular, efectos fuera del objetivo, proliferación de células T, expresión de marcadores de agotamiento y diferenciación terminal, etc.), el rendimiento en los ensayos *in vivo* (*p.ej.*, supervivencia, reducción tumoral, persistencia de células T, expansión de células T, etc.) y la experiencia clínica (*p.ej.*, remisión de la enfermedad, tasa de recaída, toxicidades, etc.). Los SAR de la divulgación pueden usarse solos o en combinación con otros SIR, CAR, cTCR, zSIR, zCD16-

SAR y otros receptores inmunitarios naturales y sintéticos conocidos en la técnica para generar un conjunto diverso de células efectoras inmunitarias para la prevención y el tratamiento de diversas afecciones causadas por o asociadas con células que expresan sus antígenos diana.

[0010] En cualquiera de las realizaciones aquí descritas, una célula efectora que expresa un SIR de un tipo muestra propiedades diversas en comparación con una célula efectora que expresa un SIR de tipo diferente (como una célula efectora que presenta en su superficie un SIR que comprende el dominio de unión a antígeno del primer SIR pero con cadenas de TCR diferentes, *p.ej.*, un SIR que comprende un scFv, un vL y/o un fragmento vH que comprende los dominios de unión a antígeno del primer SIR pero con cadenas de TCR diferentes) cuando se compara en condiciones similares. Como los SIR tienen un diseño modular, un experto en la materia puede generar tipos de SIR adicionales sustituyendo un módulo por otro. Las propiedades ejemplares en las que los SIR de tipo diferente pueden mostrar diversidad cuando se expresan en una célula efectora inmunitaria incluyen, entre otras, afinidad de unión, expresión de la superficie celular, citotoxicidad, producción de citocinas, proliferación celular, diferenciación terminal, agotamiento y actividad biológica *in vivo*. En una realización ejemplar, una célula efectora que expresa un SAR1 (SEQ ID NO: 40140) que contiene un dominio dirigido a CD19 basado en hu-mROO5-1 tiene una mayor unión a la proteína de fusión CD19-ECD-GGSG-NLuc-AcV5 tras 60 minutos de incubación a 4°C en comparación con las células efectoras correspondientes que expresan SAR2 (SEQ ID NO: 40146) o SAR3 (SEQ ID NO: 40147) dirigidas a CD19 cuando se examinan en condiciones similares y cuando ambos tipos de SAR se dirigen al locus genómico TRAC (cadena constante alfa del TCR) para descartar cualquier variación en la expresión debida a sitios aleatorios de integración de diferentes construcciones SIR. En algunas realizaciones, la unión al antígeno diana de una célula efectora que expresa un SIR de un tipo (*p.ej.*, SAR1) después de 60 minutos de incubación a 4°C es al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50% o 100% mayor que la unión al antígeno diana de una célula efectora que expresa un SAR de un tipo diferente (*p.ej.*, SAR2) que contiene el mismo dominio de unión cuando se examina en condiciones similares y cuando ambos tipos de SAR se dirigen al locus genómico TRAC (cadena constante alfa del TCR). En algunas realizaciones, la unión al antígeno diana de células efectoras que expresan SAR de diferentes tipos (*p.ej.*, SAR1, SAR2, SAR3, etc.) que contienen el mismo dominio de unión tras 60 minutos de incubación a 4°C varía en más de 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces cuando se examinan en condiciones similares y cuando ambos tipos de SAR se dirigen al locus genómico TRAC (cadena constante alfa del TCR). Las técnicas para dirigir un inserto genómico a un locus genómico específico son conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la desviación estándar en la unión al antígeno diana de las células efectoras que expresan SIR de diferentes tipos (*p. ej.* SIR1, SIR2, SIR3, etc.)

que contienen el mismo dominio de unión después de 60 minutos de incubación a 4°C es más de 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces en comparación con la desviación estándar en la unión al antígeno diana de poblaciones aisladas independientemente de células efectoras que expresan un cTCR correspondiente cuando se examinan en condiciones similares y cuando los diferentes tipos de SIR y el cTCR se dirigen al locus TRAC. En otras realizaciones de la divulgación, la desviación estándar en la citotoxicidad de células efectoras que expresan SIR de diferentes tipos (*p. ej.* SAR1, SAR2, SAR3, etc.) que contienen el mismo dominio de unión tras 4 horas de incubación a 37°C con las células diana es más de 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces en comparación con la desviación estándar en la citotoxicidad de poblaciones aisladas independientemente de células efectoras que expresan un cTCR correspondiente cuando cada uno de los tipos de SIR y el cTCR se insertan en el locus TRAC. La desviación estándar es la raíz cuadrada de la varianza y puede medirse por métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la célula efectora que expresa SIR es una célula T SIR. En algunas realizaciones, la célula efectora que expresa SIR es una célula T Jurkat que expresa SIR.

[0011] La divulgación también proporciona que un SAR con una o más cadenas TCR híbridas tiene menos probabilidades de emparejarse con las cadenas TCR endógenas en comparación con un cTCR (receptor de células T quimérico) o un SIR. En alguna realización, la divulgación proporciona que un SAR con una o más cadenas TCR híbridas muestra mayor expresión y actividad funcional (*p.ej.*, producción de citocinas, citotoxicidad, etc.) en comparación con un SAR con cadenas constantes TCR de tipo salvaje (es decir, un cTCR) cuando se expresa en células inmunitarias (*p.ej.*, células T, NK). En algunas realizaciones, la divulgación proporciona que un SAR con una o más cadenas TCR híbridas muestra una menor expresión y actividad funcional (*p. ej.*, producción de citocinas, citotoxicidad, etc.) en comparación con una construcción CAR de segunda generación cuando se expresa en células inmunitarias (*p. ej.*, células T, NK). En algunas realizaciones, la divulgación proporciona que un SAR con una o más cadenas TCR híbridas muestra una expresión, afinidad de unión y actividad funcional (*p. ej.*, producción de citocinas, citotoxicidad, etc.) inferiores en comparación con un SAR con cadenas TCR no híbridas (*p. ej.*, SIR, STAR, HIT, etc.) o un CAR de segunda generación cuando se expresa en células inmunitarias (*p. ej.*, células T, NK). En alguna realización, la divulgación proporciona que las células inmunitarias que expresan un SIR con una o más cadenas TCR híbridas muestran menos producción de citoquinas y producen menos efectos secundarios cuando se administran a un sujeto. En alguna realización, las células inmunitarias que expresan un SAR con una o más cadenas TCR híbridas muestran menos toxicidad on-target off-tumor cuando se administran a un sujeto. En una realización, las células

inmunitarias que expresan un SAR con una o más cadenas TCR híbridas son más seguras cuando se administran a un sujeto. En una realización, las células inmunitarias que expresan un SAR con una o más cadenas TCR híbridas muestran una actividad antitumoral eficaz cuando se administran a un sujeto. En una realización, las células inmunitarias que expresan un SAR con una o más cadenas TCR híbridas muestran una actividad antitumoral superior contra tumores sólidos en comparación con un CAR de segunda generación convencional.

[0012] La divulgación también proporciona SAR con una o más cadenas de TCR híbridas que se expresan a partir de un locus génico de TCR endógeno. La divulgación también proporciona SAR con una o más cadenas TCR híbridas que se dirigen al locus génico de un gen de células T endógeno (*p.ej.*, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o CD3z). En SEQ ID NO: 8396-8404 también se proporcionan ejemplos de construcciones de orientación para dirigir SAR con cadenas constantes de TCR híbrido al locus TRAC. Pueden construirse construcciones de orientación adicionales sustituyendo uno o más módulos (*p.ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, cadenas de TCR, etc.) de las construcciones mostradas en SEQ ID NO: 8396-8404 por módulos diferentes descritos en el presente documento.

[0013] La divulgación proporciona nuevos diseños SIR, Ab-TCR y MHC-SAR/HLA-SAR, incluidos aquellos con cadenas híbridas, que comprenden un dominio de activación unido a una o ambas cadenas constantes del TCR. En una realización, el dominio de activación se deriva del dominio citosólico de CD3z o FcRy o un fragmento funcional o variante del mismo. En una realización, el dominio de activación está unido operativamente al extremo C-terminal de una o ambas cadenas constantes del TCR que comprende un SIR o un Ab-TCR. En una realización, el SIR comprende un dominio coestimulador que está unido operativamente a una o ambas cadenas TCR. En una realización, el coestimulador está unido operativamente a la región C-terminal de una o ambas cadenas constantes del TCR. En una realización, el coestimulador está unido operativamente a la región C-terminal de uno o ambos dominios de activación que están unidos a una o ambas cadenas constantes TCR. En una realización, el dominio coestimulador deriva del dominio citosólico de CD28, 4-1BB, OX40, CD40, CD27, CD2, etc. Los ejemplos de cadenas TCR con dominios de activación se presentan en SEQ ID NO (DNA): 23901-25240 y SEQ ID NO (PRT): 27936-29275. Los ejemplos de cadenas TCR con dominios de activación y dominios coestimuladores se presentan en SEQ ID NO (DNA):25241-27920 y SEQ ID NO (PRT):29276-31955. Los ejemplos de SIR con cadenas de TCR que comprenden dominios de activación y/o coestimuladores se presentan en SEQ ID NO (DNA) 27922-27927 y SEQ ID NO (PRT):31957-31962. En una realización, los SIR, Ab-TCR y MHC-SAR con dominios de activación y/o coestimuladores en las cadenas constantes del TCR muestran una mejora (*p.ej.*, al menos un 5% de mejora) en la producción de citocinas, citotoxicidad y proliferación en comparación con los

SIR, Ab-TCR y MHC-SAR que carecen de los dominios de activación y/o coestimuladores en las cadenas del TCR.

[0014] Se han descrito las construcciones SAR de doble cadena que comprenden dominio de unión a antígeno unido mediante enlazadores opcionales a una o dos cadenas polipeptídicas CD3z (véanse WO 2016/187349 A1, WO 2018/102795 A1, PCT/US22/17177, incorporados en el presente documento por referencia). La divulgación proporciona SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR, zSIR, zCD16-SAR, etc.) que comprenden cadenas CD3z con delección del residuo Q101 (dQ101) en el dominio citosólico o variantes funcionales de las mismas o un homólogo de una especie no humana (*p.ej.*, ratón, perro, mono, etc.). Las cadenas CD3z de ejemplo con delección del residuo Q101 (CD3zECDTMCP-dQ101) se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 943-966 y SEQ ID NO (PRT): 9323-9346. La divulgación también proporciona que SAR (*p.ej.*, uTCR, zSIR, zCD16SAR, etc.) puede construirse usando cadenas CD3z con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de homología de aminoácidos con las cadenas CD3z que se proporcionan en SEQ ID NO (PRT): 9323-9346, 40592-40605. En una realización, ambas cadenas de un SAR de doble cadena comprenden cadenas CD3z con delección del residuo Q101. En una realización, un SAR de doble cadena comprende al menos una cadena que comprende una cadena CD3z con delección del residuo de aminoácido Q101.

[0015] En una realización, un SAR de doble cadena comprende una cadena CD3z con delección del residuo Q101 y una segunda cadena que comprende un dominio transmembrana o un dominio de anclaje de membrana. En una realización, la segunda cadena también puede comprender un dominio bisagra y opcionalmente un dominio citosólico. En una realización, un SAR de doble cadena comprende una cadena CD3z con delección del residuo Q101 y una segunda cadena que comprende un dominio bisagra y transmembrana CD16. Tal SAR se designa como z16SIR o zCD16SAR o zCD16SIR. En una realización, la segunda cadena de un zCD16SAR puede comprender además un dominio citosólico CD16. En una realización, la segunda cadena de un zCD16SAR puede comprender un dominio coestimulador. En una realización, la segunda cadena de un zCD16SAR puede comprender un dominio coestimulador, pero carece de un dominio citosólico CD16 o puede comprender un dominio citosólico CD16 parcial. En una realización, el dominio coestimulador se deriva de 4-1BB, CD28, OX40, 2B4, CD8a, CD8b o CD4. En una realización, la segunda cadena de un zCD16SAR puede comprender un dominio de señalización. En una realización, el dominio de señalización puede derivarse de una quinasa. En una realización, el dominio de señalización se deriva de Lck, Lck mutante, LAT, ZAP-70, SLP-76 o un mutante o variante de los mismos.

[0016] En una realización, un SAR de doble cadena comprende una cadena CD3z con delección del residuo Q101 y una segunda cadena que comprende una bisagra FcRy y dominios

transmembrana. Tal SAR se designa como zFcRy-SAR. En una realización, la segunda cadena puede comprender además un dominio citosólico. En una realización, la segunda cadena de un zCD16SAR puede comprender un dominio coestimulador. En una realización, el dominio citosólico de la primera cadena y/o de la segunda puede comprender uno o más ITAM. En una realización, el dominio citosólico de la primera cadena y/o la segunda puede comprender uno o más dominios coestimuladores. En una realización, el dominio citosólico de la primera cadena y/o la segunda puede comprender uno o más dominios coreceptores. Los dominios citosólicos coreceptores de ejemplo comprenden dominios citosólicos CD8a, CD8b o CD4. En una realización, el SAR que comprende una mutación dQ101 en la cadena CD3z muestra una actividad mejorada (*p.ej.*, activación de NFAT, producción de citocinas o citotoxicidad, etc.) en comparación con un SAR que comprende una cadena CD3z que carece de la mutación dQ101. La divulgación también proporciona que SAR (*p.ej.*, uTCR, zSIR, etc.) pueden construirse usando cadenas CD3z que son variantes funcionales de las cadenas CD3z híbridas que se proporcionan en SEQ ID NO (PRT): 9323-9346), incluyendo homólogos de especies no humanas. Los ejemplos de SAR con cadenas CD3z con delección del residuo Q101 se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 3171-3243 y SEQ ID (PRT): 11551-11623.

[0017] La presente divulgación también presenta nuevos SAR (*p.ej.*, "MHC-SARs") que comprenden una porción de una molécula MHC (*p.ej.*, clase I, clase II, MHC no clásico) y una porción de un receptor de señalización no-TCR o una cadena de señalización no-TCR. Ejemplos de tales receptores de señalización no-TCR y cadenas de señalización no-TCR incluyen CD3z, CD3z-dQ101, FcR γ , DAP10, DAP12, CD16A, CD16B, NKp30, NKp44 y NKp46 etc. y variantes funcionales de los mismos, incluyendo homólogos de especies no humanas. En algunas realizaciones, el MHC-SAR comprende una porción de un péptido antígeno. En una realización, el péptido comprende una trampa disulfuro para mejorar la estabilidad y expresión del MCH-SAR. La presente invención también presenta células, como células T o células NK, macrófagos, células B, células dendríticas, granulocitos, etc., que expresan dichos MHC-SAR (las células que expresan un MHC-SAR se denominan en el presente documento "células redirigidas"). Los MHC-SAR están adaptados para reconocer y unirse a los TCR apropiados (específicos). Las células redirigidas (*p.ej.*, células T redirigidas, células NK o macrófagos, etc.) que expresan un MHC-SAR imitarían a las células presentadoras de antígeno (APC), las células que normalmente expresan moléculas MHC. En algunos casos, la unión de un TCR de una célula T diana al MHC-SAR de la célula redirigida puede provocar la destrucción de la célula T diana; por lo tanto, en este caso, las células redirigidas pueden funcionar como células T, células NK o macrófagos "anti-célula T". La presente invención no se limita a las células redirigidas que funcionan para destruir una diana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula redirigida está

adaptada para ayudar a reprogramar una célula diana, *p.ej.*, la célula redirigida puede dar instrucciones a la célula diana. En una realización, el MHC-SAR puede utilizarse para eliminar células T autorreactivas para la prevención y/o el tratamiento de trastornos autoinmunes (*p.ej.*, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, etc.). Ejemplos de MHC-SAR se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 23780-23794 y SEQ ID NO (PRT): 23877-23891. Estas construcciones comprenden un péptido RQ13 unido al N-terminal del dominio HLA-DRB-B1(o D1). Estos MHC-SAR reaccionan a células T que expresan el CAR F24 (SEQ ID NO (DNA):23236 y SEQ ID NO (PRT): 23682) que reconoce el complejo péptido RQ13/HLA-DR. Como las MHC-SAR son de diseño modular, pueden construirse diferentes MHC SAR sustituyendo las cadenas de señalización de las MHC-SAR anteriores por las diferentes cadenas de señalización descritas en la presente divulgación. Por ejemplo, las cadenas [hTCRb-S57C] y [hTCRa-T48C] del MHC-SAR CD8SP-Sph-R13Q-Kpn-G4S-R1-HLA-DRB-B1-[hTCRb-S57C]-F-P2A-SP-HLA-DRA-A1-[hTCRa-T48C] representado por SEQ ID NO: 23887 puede sustituirse por diferentes cadenas TCR β y TCR α o cadenas TCR γ y TCR δ , incluidas las cadenas híbridas TCR β , TCR α , TCR γ y TCR δ descritas en la presente divulgación. Además, las cadenas [hTCRb-S57C] y [hTCRa-T48C] pueden sustituirse por cadenas TCR que comprenden dominios de activación y/o dominios coestimuladores. Del mismo modo, el péptido RQ13 RFYKTLRAEQ (SEQ ID NO: 23892) puede sustituirse por un péptido diferente (*p.ej.*, péptido MOG, NY-ESO-1 o péptido Glia-gamma1) para dirigir los TCR que reconocen estos antígenos peptídicos en complejo con las moléculas HLA. El péptido puede comprender además trampas de disulfuro para aumentar la estabilidad del complejo péptido/MHC. Por último, los módulos HLA-DRB-D1 y HLA-DRA-A1 pueden sustituirse por módulos HLA diferentes, como HLA-DQB1-D1 (SEQ ID NO: 23775) y HLA-DQA1-D1 (SEQ ID NO: 23771) o HLA-DPB1-D1 (SEQ ID NO: 23755) y HLA-DPA1-D1 (SEQ ID NO: 23752). Por ejemplo, un MHC-SAR en el que el péptido Glia-gamma1 (SEQ ID NO: 20377) sustituye al péptido RQ13 y los módulos HLA-DQB1-D1 (SEQ ID NO: 23775) y HLA-DQA1-D1 (SEQ ID NO: 23771) sustituyen a los módulos [hTCRb-S57C] y [hTCRa-T48C] puede utilizarse para dirigir células T inmunorreactivas dirigidas contra el complejo Glia-gamma1/HLA-DQ8 derivado del gluten.⁵ para la prevención y el tratamiento de la enfermedad celíaca.

[0018] La divulgación también proporciona nuevos módulos accesorios que comprenden coreceptores coestimuladores (*p.ej.*, CD8a, CD8b y CD4) que pueden coexpresarse con los SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR, zSIR, MHC-SAR, SAR de cadena híbrida, SIR, HC-SAR, Ab-TCR, etc.) de la divulgación. Se proporcionan ejemplos de coreceptores coestimuladores en SEQ ID NO (DNA) 644-646 y SEQ ID NO (PRT): 9024-9026).

[0019] La presente invención también presenta células manipuladas que expresan tanto un SAR (*p.ej.*, MHC-SAR, uTCR-SAR, SAR de cadena híbrida, SIR, zSIR, etc.) como un coreceptor sustituto (SCR). Las células de ingeniería que coexpresan un SAR (*p.ej.*, MHC-SAR, uTCR-SAR, SIR, cadena híbrida SAR, SIR, zSIR, etc.) y un SCR pueden mostrar efectos mejorados (*p.ej.*, aumento de la expresión de IL-2) en comparación con las células de ingeniería que expresan un SAR sin coexpresión de un SCR.

[0020] La divulgación proporciona nuevos SAR que comprenden cadenas de señalización con dominios citosólicos CD4, CD8b y CD8a o variantes funcionales de los mismos. Las cadenas de señalización de ejemplo con dominios citosólicos CD4, CD8b y CD8a se proporcionan en (SEQ ID NO (DNA): 555-558 y SEQ ID NO (PRT): 8925-8934. La divulgación también proporciona que SAR (*p.ej.*, uTCR, zSIR, etc.) puede construirse usando cadenas de señalización con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de homología o identidad de aminoácidos con las cadenas de señalización que se proporcionan en SEQ ID NO (PRT): 8925-8934. La divulgación también proporciona que SAR (*p.ej.*, uTCR, zSIR, etc.) pueden construirse utilizando cadenas de señalización que son variantes funcionales de las cadenas de señalización que se proporcionan en SEQ ID NO (PRT): 8925-8934, incluyendo homólogos de especies no humanas. Un ejemplo de SAR con una cadena de señalización que comprende un dominio citosólico CD4 está representado por SEQ ID NO (DNA): 1029. Un ejemplo de SAR con una cadena de señalización que comprende un dominio citosólico CD8a está representado por SEQ ID NO (DNA): 1028. Un ejemplo de SAR con una cadena de señalización que comprende un dominio citosólico CD8a y una segunda cadena de señalización que comprende un dominio citosólico CD8b está representado por SEQ ID NO (DNA): 1046. Un ejemplo de SAR con una cadena de señalización que comprende un dominio citosólico CD4 y una segunda cadena de señalización que comprende un dominio citosólico CD8a está representado por SEQ ID NO (DNA): 1047.

[0021] La divulgación proporciona nuevos SAR que comprenden cadenas de señalización con dominios coestimuladores o variantes funcionales de los mismos. Las cadenas de señalización de ejemplo con dominios citosólicos 41BB, CD28, CD30 se proporcionan en (SEQ ID NO (DNA): 545-554 y SEQ ID NO (PRT): 8935-8938. La divulgación también proporciona SAR que comprenden cadenas de señalización con al menos 70%, (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) identidad de aminoácidos con cadenas de señalización proporcionadas en SEQ ID NO (PRT): 8935-8938 y variantes funcionales de las mismas.

[0022] La divulgación proporciona enlazadores novedosos, incluidos enlazadores Ig novedosos, que pueden utilizarse para generar SAR (*p.ej.*, SIR) de la divulgación. En una realización, un enlazador Ig novedoso comprende dominios enlazadores similares a

inmunoglobulina suprimidos o mutados derivados de anticuerpos y cadenas constantes TCR. En una realización, un enlazador Ig novedoso comprende una delección o mutante puntual de cualquiera de los enlazadores descritos en SEQ ID (PRT): 8961-8994 o una variante funcional de los mismos. En una realización, un enlazador Ig novedoso comprende un enlazador con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad aminoacídica con cualquiera de los enlazadores descritos en SEQ ID (PRT): 8961-8994. En una realización, un enlazador Ig novedoso de la divulgación comprende un enlazador con delección N-terminal de entre 1-100 aminoácidos de cualquiera de los enlazadores descritos en SEQ ID (PRT): 8961-8994 o una variante funcional del mismo. En SEQ ID NO (PRT): 18259-18914 se presentan ejemplos de cadenas constantes de TCR, incluidas cadenas constantes de TCR híbridas, que comprenden delección N-terminal de dominios de enlazador similares a inmunoglobulina. La divulgación también describe que el SAR puede generarse usando variantes funcionales o mutantes de las cadenas constantes y/o enlazadores del TCR anteriores, incluyendo homólogos de especies no humanas.

[0023] En una realización, el enlazador comprende el dominio constante similar a Ig de una cadena TCR y comprende además un péptido de conexión TCR. Los ejemplos de enlazadores similar a Ig largos se proporcionan en SEQ ID NO: 22827-22829, 22833-22835, 22839-22840, 22843-22844, respectivamente y también incluyen variantes funcionales y homólogos que codifican para polipéptido con al menos 75% de identidad de secuencia a un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias anteriores. En una realización, el enlazador largo similar a Ig comprende mutantes de delección N-terminal o C-terminal de en SEQ ID NO: 22827-22829, 22833-22835, 22839-22840, 22843-22844, respectivamente, en los que se eliminan entre 1-40 (*p.ej.*, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40) residuos de aminoácidos N-terminal o C-terminal.

[0024] La divulgación proporciona SAR novedosos de doble cadena (*p.ej.*, SIR) y SAR novedosos de cadena y media (*p.ej.*, SIR) que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR en los que el dominio enlazador similar a inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO (DNA): 597-614 y SEQ ID NO (PRT):8977-8994) de una o ambas cadenas constantes TCR de un SAR de doble cadena o de un SAR de cadena y media se sustituyen por dominios enlazadores similares a Ig derivados de una cadena TCR diferente o un mutante o una variante funcional de la misma. La divulgación proporciona SAR de doble cadena (*p.ej.*, SIR) y SAR de cadena y media (*p.ej.*, SIR) novedosos que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR en los que el dominio enlazador similar a inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO: 597-614 y SEQ ID NO (PRT):8977-8994) y péptido de conexión/dominio bisagra (*p.ej.*, SEQ ID NO (DNA): 615-622 y SEQ ID NO (PRT): 8995-9002) de una o ambas cadenas constantes del TCR de un SAR de doble cadena (*p.ej.*, SIR) o de un SAR de cadena y media (*p.ej.*, SIR) se

sustituyen por dominios enlazadores similares a Ig y péptido conector (o dominios bisagra) derivados de una cadena TCR diferente o un mutante o una variante funcional de la misma. Los péptidos conectores/dominios bisagra de ejemplo de TCR α están representados por SEQ ID NO: 8995-8996), TCR β (SEQ ID NO: 8997-8998), TCR γ (SEQ ID NO: 8999-9000) y TCR δ (SEQ ID NO: 9001-9002) y se proporcionan en la **Tabla 7** de la solicitud de patente provisional. La divulgación también proporciona SAR que comprenden cadenas constantes de TCR híbridas que comprenden péptidos conectores con al menos un 70% de homología de aminoácidos con los péptidos conectores proporcionados en SEQ ID NO (PRT): 8909-8924, y variantes funcionales y mutantes de los mismos, incluyendo homólogos de especies no humanas.

[0025] La divulgación proporciona SAR novedosos de doble cadena (*p.ej.*, SIR) y SAR novedosos de una cadena y media (*p.ej.*, SIR) que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR en los que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO (DNA): 597-614 y SEQ ID NO (PRT):8977-8994) de una o ambas cadenas constantes TCR de un SAR de doble cadena o de una y media cadena son sustituidos por dominios enlazadores que no derivan de cadenas TCR o un mutante o una variante funcional de los mismos.

[0026] La divulgación también proporciona nuevos SAR de una y media cadena que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR en los que el dominio enlazador similar a inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO (DNA): 597-614 y SEQ ID NO (PRT):8977-8994 de una o ambas cadenas constantes TCR de un SAR de doble cadena o de un SAR de cadena y media se sustituyen por dominios enlazadores Ig derivados de anticuerpos/inmunoglobulinas diferentes o un mutante o una variante funcional de los mismos. En la **Tabla 7** de la solicitud provisional (SEQ ID NO (DNA):581-596 y SEQ ID NO (PRT): 8961-8976) se proporcionan ejemplos de dominios enlazadores de Ig derivados de anticuerpos/inmunoglobulinas diferentes. La divulgación también proporciona SAR que comprenden cadenas constantes TCR híbridas que comprenden enlazadores Ig con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con los enlazadores Ig proporcionados en SEQ ID NO (PRT): 8909-8924, y variantes funcionales y mutantes de los mismos, incluyendo homólogos de especies no humanas.

[0027] Los ejemplos de dominios enlazadores similares a inmunoglobulina de cadenas constantes de TCR α se proporcionan en SEQ ID NO (PRT):8977-78, 8986-88 e incluyen variantes funcionales, mutantes y homólogos de los mismos, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, los dominios enlazadores similares a inmunoglobulina de cadenas constantes de TCR α comprenden un polipéptido con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias representadas por SEQ ID NO (PRT):8977-78 y 8986-88 o una

variante funcional, mutante u homóloga de las mismas. En una realización, los dominios de enlace similares a inmunoglobulina de cadenas constantes de TCR α comprenden un polipéptido con delección de hasta 60 (*p.ej.*, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, etc.)

aminoácidos N-terminales de cualquiera de las secuencias representadas por SEQ ID NO (PRT):8977-78 y 8986-88 o una variante funcional, mutante u homóloga de las mismas.

[0028] Los dominios enlazadores similares a inmunoglobulina de ejemplo de cadenas constantes de TCR β se proporcionan en SEQ ID NO (PRT):8979-80, 8985, 8989-90 e incluyen variantes funcionales, mutantes y homólogos de los mismos, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, los dominios enlazadores similares a inmunoglobulina de cadenas constantes de TCR β comprenden un polipéptido con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias representadas por SEQ ID NO (PRT): 8979-80, 8985, 8989-90 y variantes funcionales, mutantes y homólogos de las mismas. En una realización, los dominios enlazadores similares a inmunoglobulina de cadenas constantes de TCR β comprenden un polipéptido con delección de hasta 60 (*p.ej.*, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, etc.) aminoácidos N-terminales de cualquiera de las secuencias representadas por SEQ ID NO (PRT): 8979-80, 8985, 8989-90 o una variante funcional, mutante u homóloga de las mismas.

[0029] Los ejemplos de dominios enlazadores similares a inmunoglobulina de cadenas constantes de TCR γ se proporcionan en SEQ ID NO (PRT):8981-82 y 8991-92 e incluyen variantes funcionales, mutantes y homólogos de los mismos, incluidos homólogos de especies no humanas. En una realización, los dominios enlazadores similares a inmunoglobulina de cadenas constantes de TCR γ comprenden un polipéptido con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias representadas por SEQ ID NO (PRT): 8981-82 y 8991-92 o una variante funcional, mutante u homóloga de las mismas. En una realización, el dominio enlazador similar a inmunoglobulina de cadenas constantes de TCR γ comprende un polipéptido con delección de hasta 60 (*p.ej.*, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, etc.) aminoácidos N-terminales de cualquiera de las secuencias representadas por SEQ ID NO (PRT): 8981-82 y 8991-92 o una variante funcional, mutante u homóloga de las mismas.

[0030] Los ejemplos de dominios enlazadores similares a inmunoglobulina de cadenas constantes TCR δ se proporcionan en SEQ ID NO (PRT):8983-84 y 8993-94 e incluyen variantes funcionales, mutantes y homólogos de los mismos, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, los dominios enlazadores similares a inmunoglobulina de cadenas constantes de TCR δ comprenden un polipéptido con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las

secuencias representadas por SEQ ID NO (PRT): 8983-84 y 8993-94 o una variante funcional, mutante u homóloga de las mismas. En una realización, el dominio enlazador similar a inmunoglobulina de cadenas constantes de TCR δ comprende un polipéptido con delección de hasta 60 (*p.ej.*, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, etc.) aminoácidos N-terminales de cualquiera de las secuencias representadas por SEQ ID NO (PRT): 8983-84 y 8993-94 o una variante funcional, mutante u homóloga de las mismas.

[0031] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de doble cadena (DC) y un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR que están unidos operativamente mediante enlazadores opcionales a una o más cadenas constantes TCR híbridas. En una realización, las cadenas constantes TCR híbridas comprenden una cadena en la que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de una cadena constante TCR se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de una cadena constante TCR diferente o un homólogo o variante de la misma con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos. En una realización, una cadena constante TCR α híbrida comprende una cadena en la que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR α se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR β , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α o un homólogo o variante de la misma con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% del 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos. En una realización, una cadena constante TCR β híbrida comprende una cadena en la que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR β se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR α , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α o un homólogo o variante de la misma con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% del 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos. En una realización, una cadena constante TCR γ híbrida comprende una cadena en la que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR γ se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR α , TCR β , TCR δ o pre-TCR α o un homólogo o variante de la misma con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% del 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos. En una realización, una cadena constante TCR δ híbrida comprende una cadena en la que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR δ se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR α , TCR β , TCR γ o pre-TCR α o un homólogo o variante de la misma con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% del 100%) de identidad de secuencia de

aminoácidos. En una realización, una cadena constante pre-TCR α híbrida comprende una cadena en la que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante pre-TCR α se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o un homólogo o variante de la misma con al menos un 70% (p.ej., 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% del 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos.

[0032] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de doble cadena (DC) y un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprenden uno o más dominios unión a antígeno no-TCR que están unidos operativamente mediante enlazadores opcionales a cadenas TCR híbridas en las que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR α se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR β o un mutante o variante del mismo y el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR β se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR α o un mutante o variante del mismo.

[0033] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de doble cadena (DC) y un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprenden uno o más dominios unión a antígeno no-TCR que están unidos operativamente mediante enlazadores opcionales a cadenas TCR híbridas en las que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR γ se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR δ o un mutante o variante del mismo y el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR δ se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR γ o un mutante o variante del mismo.

[0034] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de doble cadena (DC) y un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprenden uno o más dominios unión a antígeno no-TCR que están unidos operativamente mediante enlazadores opcionales a cadenas TCR híbridas en las que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR α se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR γ o un mutante o variante del mismo y el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR β se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR δ o un mutante o variante del mismo.

[0035] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de doble cadena (DC) y un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR que están unidos operativamente mediante enlazadores opcionales a cadenas TCR híbridas en las que el dominio enlazador similar a inmunoglobulina de la cadena constante TCR α se sustituye por el dominio enlazador similar a inmunoglobulina

de la cadena constante TCR δ o un mutante o variante del mismo y el dominio enlazador similar a inmunoglobulina de la cadena constante TCR β se sustituye por el dominio enlazador similar a inmunoglobulina de la cadena constante TCR γ o un mutante o variante del mismo.

[0036] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de doble cadena (DC) y un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprenden uno o más dominios unión a antígeno no-TCR que están unidos operativamente mediante enlazadores opcionales a cadenas TCR híbridas en las que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR γ se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR α o un mutante o variante del mismo y el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR δ se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR β o un mutante o variante del mismo.

[0037] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de doble cadena (DC) y un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprenden uno o más dominios unión a antígeno no-TCR que están unidos operativamente mediante enlazadores opcionales a cadenas TCR híbridas en las que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR γ se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR β o un mutante o variante del mismo y el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR δ se sustituye por el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR α o un mutante o variante del mismo.

[0038] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de doble cadena (DC) y un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR que están enlazados operativamente mediante enlazadores opcionales a cadenas TCR híbridas en las que el dominio enlazador similar a inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO (DNA): 597-6714 y SEQ ID NO (PRT):8977-8994) de una o ambas cadenas constantes de TCR de un SAR de doble cadena o de un SAR de cadena y media se sustituyen por dominios enlazadores de Ig derivados de una cadena ligera de inmunoglobulina (Ig) o una cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) o un mutante o variante de las mismas.

[0039] Un ejemplo de dominio enlazador de inmunoglobulina derivado de la cadena ligera de inmunoglobulina (IgCL) se proporciona en SEQ ID NO (PRT):8961 e incluye variantes funcionales, mutantes y homólogos del mismo, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, dominio enlazador de inmunoglobulina de cadena ligera de inmunoglobulina (IgCL) comprende un polipéptido con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 995%) de homología de secuencia de aminoácidos con una secuencia representada por SEQ ID NO (PRT): 8961 o una variante funcional, mutante u homóloga de la misma. En una

realización, el dominio enlazador de inmunoglobulina de la cadena ligera de inmunoglobulina (IgCL) comprende un polipéptido con delección de hasta 80 (*p.ej.*, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, etc.) aminoácidos N-terminales de cualquiera de las secuencias representadas por SEQ ID NO (PRT): 8961 o una variante funcional, mutante u homóloga de la misma.

[0040] Los ejemplos de dominios enlazadores de inmunoglobulina derivados de cadenas pesadas de inmunoglobulina (*p.ej.*, IgG1-CH1, IgG2-0C-CH1, IgG4-CHI1, etc.) se proporcionan en SEQ ID NO s(PRT):8962-8976 e incluyen variantes funcionales, mutantes y homólogos de los mismos, incluidos homólogos de especies no humanas. En una realización, el dominio enlazador de inmunoglobulina de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende un polipéptido con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 995%) de homología de secuencia de aminoácidos con una secuencia representada por SEQ ID NO (PRT): 8962-8976 o una variante funcional, mutante u homóloga de la misma. En una realización, el dominio enlazador de inmunoglobulina de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende un polipéptido con delección de hasta 80 (*p.ej.*, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, etc.) aminoácidos N-terminales de cualquiera de las secuencias representadas por SEQ ID NO (PRT): 8962-8976 o una variante funcional, mutante u homóloga de la misma.

[0041] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprende uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR que están unidos operativamente mediante enlazadores opcionales a cadenas TCR híbridas en las que el dominio enlazador similar a inmunoglobulina de la cadena constante TCR α o TCR γ se sustituye por el dominio enlazador de inmunoglobulina de la cadena ligera de inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO (PRT): 8961) o un mutante o variante del mismo y el dominio enlazador similar a inmunoglobulina de la cadena constante TCR β o TCR δ se sustituye por el dominio enlazador de inmunoglobulina de la cadena pesada de inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO: (PRT):8962-8976) o un mutante o variante del mismo.

[0042] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprende uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR que se unen operativamente mediante enlazadores opcionales a cadenas TCR híbridas en las que el dominio enlazador similar a inmunoglobulina de la cadena constante TCR β o TCR δ se sustituye por el dominio enlazador de inmunoglobulina de la cadena ligera de inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO (PRT): 8961) o un mutante o variante del mismo y el dominio enlazador similar a inmunoglobulina de la cadena constante de TCR α o TCR γ se sustituye por el dominio enlazador de inmunoglobulina de la cadena pesada de inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO: (PRT):8962-8976) o un mutante o variante del mismo.

[0043] En realizaciones de ejemplo, la divulgación proporciona un novedoso SAR de cadena y media (OHC) que comprende uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR que están unidos operativamente mediante enlazadores opcionales a cadenas TCR híbridas en las que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR γ se sustituye por el dominio enlazador de inmunoglobulina de la cadena ligera de inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO (PRT): 8961) o un mutante o variante del mismo y el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina de la cadena constante TCR δ se sustituye por el dominio enlazador de inmunoglobulina de la cadena pesada de inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO: (PRT):8962-8976) o un mutante o variante del mismo.

[0044] La divulgación proporciona nuevos SIR de una y media cadena en los que el dominio enlazador similar a la inmunoglobulina (*p.ej.*, SEQ ID NO (DNA): 597-614 y SEQ ID NO (PRT):8977-8994) de una o ambas cadenas constantes TCR de un SIR de cadena y media se sustituyen por dominios enlazadores Ig derivados de un anticuerpo (*p.ej.*, IgCL, dominio IgG1-CH1) o un mutante o variante del mismo. Los dominios enlazadores de Ig derivados de un anticuerpo se proporcionan en SEQ ID NO: 581-596 y SEQ ID NO (PRT): 8961-8975). Ejemplos de tales construcciones SAR se proporcionan en SEQ ID NO (DNA):18023- 18258 y SEQ ID NO (PRT):18915-19740.

[0045] La divulgación también proporciona nuevos TCR de cadena híbrida que comprenden dos cadenas en las que los dominios variables del TCR (*p.ej.*, Va y Vb o Vg y Vd) están unidos mediante enlazadores Ig (*p.ej.*, IgCL e IgG1-CH1 o IgCL e IgG4-CH1, etc.) a módulos TCR que comprenden los dominios transmembrana de las cadenas TCR. En una realización, los módulos TCR comprenden además el péptido conector y el dominio citosólico de las cadenas TCR. Ejemplos de tales cadenas híbridas de TCR dirigidas al complejo de péptido NY-ESO-1/HLA-A2 se presentan en SEQ ID NO (DNA): 19760 y 19761 y SEQ ID NO (PRT): 20380 y 20381, respectivamente. En la construcción NY-ESO-1-IG4-Vb-[IgCL-TCRb-wt-opt2-6MD]-F-P2A-NY-ESO-1-IG4-Va-[IgG1-CH1-TCRa-wt-op2-6MD](SEQ ID NO:19760), el dominio Vb de un TCR dirigido a NY-ESO-1 se une mediante un enlazador IgCL a un módulo TCRb-wt-opt2-6MD que comprende el péptido conector, el dominio transmembrana y el dominio citosólico de la cadena TCR β humana, mientras que el dominio Va del TCR se une mediante un enlazador IgG1-CH1 a un módulo TCRa-wt-op2-6MD que comprende el péptido conector, el dominio transmembrana y el dominio citosólico de la cadena TCR α humana. La construcción TCR de cadena híbrida con SEQ ID NO (DNA): 19761 y SEQ ID NO (PRT): 20381 es similar excepto en que el módulo TCRb-wt-opt2-6MD se sustituye por un módulo IgCL-TCRg-6MD que comprende el péptido conector, el dominio transmembrana y el dominio citosólico de la cadena TCR γ humana, mientras que el TCRa-wt-op2-6MD se sustituye por un módulo TCR δ -6MD que

comprende el péptido conector, el dominio transmembrana y el dominio citosólico de la cadena TCR δ humana. Es menos probable que las dos cadenas TCR del TCR de cadena híbrida se emparejen con las cadenas TCR endógenas y, por lo tanto, es menos probable que las células T que expresan dicho TCR de cadena híbrida causen autoinmunidad o enfermedad de injerto contra huésped (EICH). En algunas realizaciones, los enlazadores IgCL e IgG1-CH1 se sustituyen por otros enlazadores Ig (*p.ej.*, IgCL e IgG4-CH1) descritos en la presente solicitud para generar TCR de cadena híbrida con propiedades estructurales y funcionales únicas. Del mismo modo, los módulos TCR pueden sustituirse por otros módulos TCR descritos en la presente solicitud para generar TCR de cadena híbrida únicos. Por último, los dominios variables pueden sustituirse por otros dominios variables descritos en la presente solicitud para generar TCR de cadena híbrida dirigidos a diferentes complejos péptido/HLA. En algunas realizaciones, uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) (*p.ej.*, vHH, FHVH, Darpin, afibodina, centyrina, svd-TCR, etc.) se unen al N-terminal o cerca del N-terminal de los dominios variables del TCR (*p.ej.*, Va, Vb, Vg, Vd) de los TCR de cadena híbrida para generar TCR de cadena híbrida biespecíficos y multiespecíficos capaces de dirigirse a más de un antígeno y/o complejo péptido antígeno/MHC.

[0046] En alguna realización, las células que responden a la inmunidad (*p.ej.*, T, NK, NKT, etc.) o las células madre hematopoyéticas para la expresión de SAR se obtienen de la sangre circulante de un individuo mediante aféresis. En un aspecto, las células se obtienen de un sujeto en el que las células T, NK o madre se han movilizadas mediante la administración de un agente. En algunas realizaciones, las células inmunitarias se recogen de un donante al que se ha administrado un antagonista de CXCR4 (*p.ej.*, Plerixafor, BL-8040, BPRCX714, BPRCX807), una citoquina (*p.ej.*, G-CSF, GM-CSF o Sargramostim, Neulasta o Pegfilgrastim, IL2, IL15), un agonista beta2 (*p.ej.*, epinefrina), un inhibidor de la tirosina quinasa (*p.ej.*, Dasatinib), fármaco(s) de quimioterapia (*p.ej.*, ciclofosfamida, doxorrubicina, etc.), ya sea por separado o en combinación, antes de la recogida de células inmunitarias. En algunas realizaciones, el donante es un donante autólogo, mientras que, en otras realizaciones, el donante es un donante alogénico.

[0047] La divulgación también proporciona un método libre de expansión para generar células que responden a la inmunidad y expresan un SAR (*p.ej.*, SIR, zSIR, Ab-TCR, uTCR-SAR, CD16-SAR, etc.) de la divulgación. En una realización, el SAR es un SAR de doble cadena. En una realización, el SAR es un SAR de cadena y media. En una realización, el SAR carece de un dominio de señalización citosólica. En una realización, el SAR carece de un dominio de activación citosólica que comprende un ITAM. En una realización, el SAR carece de un dominio coestimulador. En una realización, el SAR no comprende un dominio coestimulador

CD28 o 41BB. En una realización, el SAR proporciona señalización fisiológica del receptor de células T o del receptor NK. En una realización, el SAR comprende un módulo receptor de células T. En una realización, el SAR es capaz de reclutar un adaptador de señalización. En una realización, el adaptador de señalización se selecciona del grupo de CD3z, FcRy, DAP10, DAP12. En una realización, el SAR no es un receptor de antígeno quimérico de segunda generación. En una realización, el SAR no comprende un dominio de activación CD3z o FcRy. En una realización, el SAR comprende una cadena de señalización TCR seleccionada entre TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ , pre-TCR α , CD16, NKp30, NKp44, NKp46 o un fragmento funcional, variante u homólogo de los mismos. En una realización, el SAR se selecciona del grupo de un SIR de cadena doble, un SIR de cadena y media, un Ab-TCR de cadena doble, un Ab-TCR de cadena y media, un SIR de cadena doble con cadenas TCR híbridas; un SIR de cadena y media con cadenas TCR híbridas; un zSIR, un uTCR-SAR, un TFP, CD16-SAR, un FceRy-SIR y un vFLIP-CAR.

[0048] En una realización, una o más etapas del método sin expansión para la fabricación del producto de terapia celular se llevan a cabo en un sistema cerrado. En una realización, uno o más pasos del método sin expansión para la fabricación del producto de terapia celular se llevan a cabo de forma automatizada. En una realización, uno o más pasos del método sin expansión para la fabricación del producto de terapia celular se llevan a cabo utilizando Prodigy (Miltenyi), Cocoon (Lonza), o una lanzadera celular (Cellares). En una realización, uno o más pasos del método libre de expansión para la fabricación del producto de terapia celular se llevan a cabo utilizando un dispositivo permeable al gas. En una realización, uno o más pasos del método sin expansión para la fabricación del producto de terapia celular se llevan a cabo en un dispositivo G-Rex (fabricación Wilson-Wolf). En una realización, uno o más pasos del método sin expansión para la fabricación del producto de terapia celular se llevan a cabo utilizando un biorreactor de ondas.

[0049] En una realización, el método sin expansión para la generación de SAR que expresan SAR comprende los pasos de a) obtención de una población de células efectoras inmunitarias (*p.ej.*, PBMC) de un sujeto, en el que opcionalmente se ha administrado al sujeto uno o más agentes movilizadores (*p.ej.*, antagonista de CXCR4, *p.ej.*, Plerixafor, BL-8040, BPRCX714, BPRCX807 etc.), una citoquina (*p.ej.*, G-CSF, GM-CSF o Sargramostim, Neulasta o Pegfilgastrim, IL2, IL15); b) un paso opcional para aislar una subpoblación de células efectoras inmunitarias (*p.ej.*, células T, CD4, CD8, Treg, células $\alpha\beta$ T, células $\gamma\delta$ T, células NK, células NKT, células madre que expresan Pgp como células T o NK, etc.); c) un paso opcional para eliminar la expresión de uno o más genes (*p.ej.*, β 2M, TRAC, TRBC, etc.) en las células efectoras inmunitarias; d) un paso opcional para activar las células efectoras inmunitarias con

una o más citocinas, en el que opcionalmente las citocinas se seleccionan del grupo de IL2, IL7, IL15 o una combinación de las mismas; e) un paso opcional para activar las células efectoras inmunitarias con un agente que activa el TCR, en el que opcionalmente el agente es un anticuerpo contra CD3 o perlas recubiertas de anticuerpo contra CD3; f) un paso opcional para añadir un agente coestimulador durante el paso de activación de (e), en el que opcionalmente el agente coestimulador activa el receptor CD28 o el receptor 4-1BB, en el que opcionalmente el agente es un anticuerpo o microesferas recubiertas de anticuerpo dirigido contra CD28 o 4-1BB; g) introducir una construcción de expresión SAR en las células efectoras inmunitarias; en el que opcionalmente la construcción de expresión SAR se introduce poniendo en contacto las células efectoras inmunitarias durante un tiempo suficiente con un vector viral que codifica el SAR, en el que opcionalmente el vector viral es un vector lentiviral o un vector γ retroviral; en donde opcionalmente el contacto se lleva a cabo en presencia de un agente que aumenta la transducción génica con el vector viral, en donde opcionalmente el agente se selecciona del grupo de polibreno, protamina, retronectina, vectofusina o una combinación de los mismos; h) un paso opcional para eliminar el agente activador o las perlas recubiertas de agente activador; i) una etapa opcional de lavado; j) una etapa opcional de concentración del producto de terapia celular; k) una etapa opcional de crioconservación del producto de terapia celular; l) etapas opcionales de pruebas de seguridad y potencia.

[0050] En una realización, la construcción de expresión SAR (*p.ej.*, ARN, vector viral) se introduce en las células efectoras inmunitarias o células madre que pueden dar lugar a células efectoras inmunitarias en menos de 12 horas (*p.ej.*, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 2 h, 1 h, 30 min, 20 min, 10 min, 5 min, 1 min, etc.) de la extracción de las células de un sujeto. En una realización, la construcción de expresión SAR (*p.ej.*, ARN, vector viral) se introduce en las células efectoras inmunitarias o células madre que pueden dar lugar a células efectoras inmunitarias durante el paso de recogida (*p.ej.*, aféresis). En una realización, la construcción de expresión SAR (*p.ej.*, ARN, vector viral) se introduce en las células efectoras inmunitarias o células madre que pueden dar lugar a células efectoras inmunitarias en el mismo contenedor (*p.ej.*, bolsa) en el que se recoge el producto celular de aféresis del sujeto. En una realización, la construcción de expresión SAR (*p.ej.*, ARN, vector viral) se introduce en las células efectoras inmunitarias o células madre que pueden dar lugar a células efectoras inmunitarias en el mismo lugar (*p.ej.*, instalación de recogida, sala) en el que se recoge el producto celular de aféresis del sujeto. En una realización, la construcción de expresión SAR (*p.ej.*, ARN, vector viral) se introduce en las células efectoras inmunitarias o células madre que pueden dar lugar a células efectoras inmunitarias utilizando una unidad acoplada operativamente a la máquina de aféresis. En una realización, la construcción de expresión SAR (*p.ej.*, ARN, vector viral) se introduce en las

células efectoras inmunitarias o células madre que pueden dar lugar a células efectoras inmunitarias utilizando una unidad cerrada que está unida operativamente a la máquina de aféresis.

[0051] En una realización, las células que expresan la construcción de expresión SAR se administran al sujeto en menos de 36 horas (*p. ej.*, menos de 36 h, 24 h, 20 h, 16 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 2 h, 1 h, 30 min, 20 min, 10 min, 5 min, 1 min, etc.) tras su recogida del sujeto (es decir, tiempo de vena a vena). En una realización, las células que expresan la construcción de expresión SAR se administran al sujeto desde el mismo contenedor (*p. ej.*, bolsa) en el que se recogen las células en el momento de la aféresis. En una realización, las células que expresan la construcción de expresión SAR se administran al sujeto en el mismo lugar (*p. ej.*, instalación de recogida, sala de recogida) en el que se recogen las células del sujeto en el momento de la aféresis. En una realización, las células que expresan la construcción de expresión SAR se administran al sujeto utilizando una unidad que está unida operativamente a la máquina de aféresis o forma parte de la máquina de aféresis o está integrada con la máquina de aféresis. En una realización, las células que expresan la construcción de expresión SAR se administran al sujeto utilizando una unidad cerrada que está unida operativamente a la máquina de aféresis.

[0052] En una realización, los pasos de recogida (es decir, aféresis) de las células inmunitarias o madre, introducción del SAR en las células inmunitarias o madre y administración de las células inmunitarias o madre que expresan SAR al sujeto se llevan a cabo en menos de 36 horas (*p. ej.*, menos de 36 h, 24 h, 20 h, 16 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 2 h, 1 h, 30 min, 20 min, 10 min, 5 min, 1 min, etc.). En una realización, los pasos de recogida (es decir, aféresis) de las células inmunitarias o madre, introducción del SAR en las células inmunitarias o madre y administración de las células inmunitarias o madre que expresan SAR al sujeto se llevan a cabo en una única visita. En una realización, los pasos de recogida (es decir, aféresis) de las células inmunitarias o madre, introducción del SAR en las células inmunitarias o madre y administración de las células inmunitarias o madre que expresan SAR al sujeto se llevan a cabo en una única ubicación (*p. ej.*, instalación de recogida, sala de recogida). En una realización, los pasos de recogida (es decir, aféresis) de las células inmunitarias o madre, introducción del SAR en las células inmunitarias o madre y administración de las células inmunitarias o madre que expresan SAR al sujeto se llevan a cabo utilizando una única máquina. En una realización, los pasos de recogida (es decir, aféresis) de las células inmunitarias o madre, introducción del SAR en las células inmunitarias o madre y administración de las células inmunitarias o madre que expresan SAR al sujeto se llevan a cabo utilizando máquinas (unidades) vinculadas entre sí desde el punto de vista operativo. En una realización, los pasos de recogida (es decir, aféresis) de las células inmunitarias o madre, introducción del SAR en las células inmunitarias o madre y

administración de las células inmunitarias o madre que expresan SAR al sujeto se llevan a cabo utilizando una única máquina o máquinas (unidades) que comparten una única fuente de energía (*p. ej.*, fuente eléctrica). En una realización, los pasos de recogida (es decir, aféresis) de las células inmunitarias o madre, introducción del SAR en las células inmunitarias o madre y administración de las células inmunitarias o madre que expresan SAR al sujeto se llevan a cabo utilizando una única máquina o máquinas (unidades) controladas por un único ordenador o programa informático. En una realización, los pasos de recogida (es decir, aféresis) de las células inmunitarias o madre, introducción del SAR en las células inmunitarias o madre y administración de las células inmunitarias o madre que expresan SAR al sujeto se llevan a cabo utilizando un único sistema cerrado. En una realización, el SAR se introduce en las células inmunitarias o células madre que pueden dar lugar a células inmunitarias a través de cualquier método de transducción de genes conocido en la técnica, incluidos, entre otros, vectores virales (*p. ej.*, lentivirales, γ retrovirales), partículas similares a virus, nanopartículas lipídicas, electroporación, lipofección o provocando perturbaciones transitorias en las membranas celulares.

[0053] En una realización, el método de células libres de expansión comprende incubar una población de células inmunitarias (*p.ej.*, células T, *p.ej.*, células T recién aisladas, *p.ej.*, células T quiescentes recién aisladas) en un medio que no comprende suero, o que comprende no más de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, o 2% de suero, *p. ej.*, durante al menos unas 1-10 horas, *p.ej.*, durante al menos unas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 horas, *p.ej.*, durante al menos unas 2-6 horas; y (ii) transducir la población de células inmunitarias con una molécula de ácido nucleico, *p.ej.*, una molécula de ácido nucleico en un vector lentiviral, que codifica el SAR, en un medio que comprende suero (*p.ej.*, al menos aproximadamente 4, 5, o 6% de suero) y opcionalmente desoxinucleósidos (*p.ej.*, al menos aproximadamente 40 μ M- 1.5 mM de desoxinucleósidos, *p.ej.*, al menos unos 40 μ M, 45 μ M, 50 μ M, 55 μ M, 60 μ M, 70 μ M, 80 μ M, 90 μ M, 1 mM, 1.1 mM, 1.2 mM, 1.3 mM, 1.4 mM o 1.5 mM de desoxinucleósidos), *p.ej.*, durante unas 14-30 horas, *p.ej.* durante aproximadamente 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, o 28 horas, opcionalmente donde el paso (ii) se realiza a una concentración celular de al menos aproximadamente 0.7×10^7 , 0.8×10^7 , 0.9×10^7 , 1×10^7 , 2×10^7 , 4×10^7 , 6×10^7 , 8×10^7 o 1×10^8 células/mL, *p. ej.*, el paso (ii) se realiza a una concentración celular de aproximadamente 1×10^7 células/mL. En una realización, opcionalmente, la población de células inmunitarias no se pone en contacto *in vitro* con un agente que estimule un complejo CD3/TCR y/o un agente que estimule una molécula coestimuladora, *p.ej.*, anticuerpo anti-CD3 y/o anticuerpo anti-CD28. En una realización, el método libre de expansión comprende (iii) cosechar la población de células inmunitarias para almacenamiento (*p.ej.*, reformular la población de células inmunitarias en

medios de criopreservación) o administración, en donde: (a) la etapa (iii) se realiza no más tarde de 48 horas, *p.ej.*, no más tarde de 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, o 32 horas después del inicio de la etapa (i), (b) la población de células inmunitarias de la etapa (iii) no se expande, o se expande en no más del 10, 20, 30, 40, o 50%, *p.ej.*, no más del 10%, en comparación con la población de células inmunitarias al comienzo de la etapa (i), (c) el porcentaje de células vírgenes, *p.ej.*, células T vírgenes, en la población de células inmunitarias de la etapa (iii) no se reduce, o se reduce en no más del 10, 20, o 30%, en comparación con el porcentaje de células vírgenes, *p.ej.*, células T ingenuas, en la población de células inmunitarias al comienzo de la etapa (i), y/o (d) el porcentaje de células diferenciadas, *p.ej.*, células T diferenciadas, *p.ej.*, células T diferenciadas terminalmente, *p.ej.*, El porcentaje de células diferenciadas, *p.ej.*, células T diferenciadas, *p.ej.*, células T diferenciadas terminalmente, *p.ej.*, células T CCR7^{low}, en la población de células inmunitarias de la etapa (iii) no se incrementa, o se incrementa en no más del 10, 20 o 30%, en comparación con el porcentaje de células diferenciadas, *p.ej.*, células T diferenciadas, *p.ej.*, células T diferenciadas terminalmente, *p.ej.*, células T CCR7^{low}, en la población de células inmunitarias al comienzo de la etapa (i). En una realización, en la que el paso (i) comprende incubar la población de células inmunitarias (*p.ej.*, células T, *p.ej.*, células T recién aisladas, *p.ej.*, células T quiescentes recién aisladas) en un medio que no comprende suero durante aproximadamente 2-6 horas.

[0054] En una realización, el producto de terapia celular se expande durante 1-10 días tras la introducción de la construcción de expresión SAR.

[0055] En una realización, el vector viral (*p.ej.*, lentiviral o γ retroviral) que codifica el SAR está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura de babuino modificada, una glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada, una glicoproteína de envoltura de VSVG. En una realización, el vector viral (*p. ej.*, lentiviral o γ retroviral) que codifica el SAR está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura de babuino modificada descrita en el presente documento. En una realización, la glicoproteína de envoltura de babuino modificada comprende una secuencia con SEQ ID NO (DNA):70-96, 98, 115-122, 264-273 o SEQ ID NO(PRT):8450-8476, 8478, 8495-8502, 8644-8655, 50005-50010 o una glicoproteína de envoltura codificada con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO(PRT):8450-8476, 8478, 8495-8502, 8644-8655, 50005-50010 en el dominio extracelular. En una realización, la glicoproteína de envoltura de babuino modificada codifica para una proteína que comprende una secuencia con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO(PRT):8450-8476, 8478, 8495-8502, 8644-8655, 50005-50010 en el dominio transmembrana. En una realización, la glicoproteína de envoltura de babuino modificada codifica para una proteína que se une a hASCT1 o hASCT2.

[0056] En una realización, el vector viral (*p.ej.*, lentiviral o γ retroviral) que codifica el SAR está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura HERV-W1 modificada descrita en el presente documento. En una realización, la glicoproteína de envoltura HERV-W1 modificada está codificada por un polinucleótido recombinante que codifica para una secuencia de péptido señal exógena. En una realización, el vector viral (*p.ej.*, lentiviral o γ retroviral) que codifica el SAR está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada con SEQ ID NO (DNA): 149-151, 159-164 o SEQ ID NO (PRT): 8529-8530, 8539-8544, 8581 o una glicoproteína de envoltura codificada con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO (PRT): 8529-8530, 8539-8544, 8581 en el dominio extracelular. En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada codifica para una proteína que comprende una secuencia con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% de homología de secuencia con la SEQ ID NO (PRT): 8529-8530, 8539-8544, 8581 en el dominio transmembrana. En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada codifica para una proteína que se une a hASCT1 o hASCT2.

[0057] En una realización, las células efectoras inmunitarias se transducen con vectores virales que codifican SAR que están pseudotipados con una combinación de dos o más glicoproteínas de envoltura diferentes (*p.ej.*, babuino más VSVG o HERV-W1 o VSVG, etc.). En una realización, la construcción de expresión SAR se introduce en células efectoras inmunitarias utilizando un método de administración no viral. En una realización, el método no viral comprende una partícula similar a un virus (VLP) o una nanopartícula lipídica (LNP). En una realización, la construcción de expresión SAR se introduce en células efectoras inmunitarias mediante electroporación, lipofección o perturbación transitoria de la membrana celular. En una realización, el SAR se expresa a partir de un locus génico endógeno. En una realización, el casete de expresión SAR se inserta en el locus genómico de un gen endógeno. En una realización, la inserción de SAR en el locus del gen endógeno resulta en una expresión alterada del gen endógeno. En una realización, SAR se expresa bajo el promotor y elementos reguladores de un gen endógeno. En una realización, el locus del gen endógeno se selecciona entre TRAC, TRBC, TRDC, TRGC, CD3z, CD16, locus del gen Fc ϵ Ry1.

[0058] En una realización, el producto de terapia celular con codificación SAR generado mediante el método sin expansión es superior a un producto fabricado mediante un método que implica la expansión del producto de terapia celular en uno o más de los siguientes aspectos: a) se fabrica en un periodo de tiempo más corto (*p.ej.*, entre 1-12 días); b) da lugar a un ahorro de costes (*p.ej.*, entre un 5-95% de reducción de costes en comparación con el método de expansión); c) da lugar a menos fallos de fabricación (*p.ej.*, 5-95% menos fallos de fabricación en comparación con el método de expansión); d) muestra propiedades *in vitro* superiores (*p.ej.*, al

menos un 5% de mejora en uno o más de los siguientes parámetros en comparación con el método de expansión: destrucción celular, producción de citoquinas, ausencia de marcadores de agotamiento, mantenimiento de la relación CD4:CD8; ausencia de diferenciación terminal, mantenimiento del fenotipo similar a madre/vírgenes/memoria; e) muestra una actividad *in vivo* superior (*p.ej.*, al menos un 5% de mejora en uno o más de los siguientes parámetros en comparación con el método de expansión: persistencia a largo plazo, ausencia de agotamiento, actividad antitumoral, etc.); f) al menos un 5% de control superior de la enfermedad (*p.ej.*, control tumoral) cuando se administra a un sujeto que lo necesita; g) muestra una seguridad superior (*p.ej.*, g) muestra una seguridad superior (*p. ej.*, síndrome de liberación de citoquinas o neurotoxicidad reducidos en al menos un 5% en comparación con un producto fabricado mediante el método de expansión, etc.); h) requiere la administración de una dosis celular menor (*p. ej.*, reducción de al menos un 5% en la dosis celular administrada en comparación con un producto de terapia celular fabricado mediante el método de expansión).

[0059] La divulgación proporciona diseños de SAR de nueva generación de cadena simple y doble que proporcionan señalización fisiológica.

[0060] La divulgación proporciona SAR de cadena simple y doble de próxima generación que comprenden uno o más dominios heterólogos de unión a antígeno (*p. ej.*, vL, vH, scFv, vHH, FHVH, andamiaje de unión a antígeno no inmunoglobulina, epítipo, etc.) que están unidos operativamente al N-terminal o cerca del N-terminal de los dominios extracelulares de cadenas CD16 que comprenden dominios citoplasmáticos CD16 suprimidos y/o mutados. Los ejemplos de cadenas CD16 con dominios citoplasmáticos suprimidos y mutados que pueden utilizarse en la construcción de SAR se proporcionan en SEQ ID NO (PRT): 8945-8948. En una realización, el SAR puede construirse utilizando cadenas CD16 con al menos un 70% de homología de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8945-8948 o variantes funcionales de las mismas. Los SAR de ejemplo con dominios citoplasmáticos suprimidos y mutados se presentan en SEQ ID NO (DNA):1111-2234 y SEQ ID NO (PRT): 9491-10614. En una realización, el SAR puede construirse en el que uno o más dominios de unión a antígeno se unen al N-terminal o cerca del N-terminal del dominio extracelular completo o parcial de las cadenas CD16 representadas por SEQ ID NO (PRT): 8945-8948 o variantes funcionales de las mismas.

[0061] La divulgación proporciona SAR de cadena simple y doble de próxima generación que comprenden uno o más dominios heterólogos de unión a antígeno que están unidos operativamente al N-terminal o cerca del N-terminal de los dominios extracelulares de cadenas CD16 (*p.ej.*, FCGR1A, FCGR1B, FCGR1C) que comprenden dominios citoplasmáticos CD64 suprimidos y/o mutados. En la SEQ ID NO (PRT): 20383 se proporcionan ejemplos de cadenas

CD64 con dominios citoplasmáticos suprimidos y mutados que pueden utilizarse en la construcción de SAR. En una realización, el SAR puede construirse usando cadenas CD64 con al menos un 70% de homología de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 20382-83 o variantes funcionales de las mismas. En una realización, el SAR puede construirse en el que uno o más dominios de unión a antígeno se unen al N-terminal o cerca del N-terminal del dominio extracelular completo o parcial de las cadenas CD64 representadas por SEQ ID NO (PRT): 20382-83 o variantes funcionales de las mismas.

[0062] La divulgación proporciona nuevos dominios de unión a antígenos (*p.ej.*, scFv, vL, vH, vHH, etc.) dirigidos a diferentes antígenos. Los fragmentos vL novedosos están representados por SEQ ID NO (DNA): 339-354, 19766-19776, y 32006-32068, los fragmentos vH complementarios están representados por 363- 378, 19785-19795, y 32069-32131 (**Tablas 3 y 5**). La divulgación también proporciona nuevos dominios vHH, incluyendo vHH humanizados, dirigidos a diferentes antígenos. Estos dominios vHH están representados por SEQ ID NO: 412-426, 32195-32213. Estos dominios de unión a antígeno novedosos (*p.ej.*, scFv, vL, vH, vHH, etc.) pueden utilizarse en la construcción de SAR (*p.ej.*, SIR, zSIR, Ab-TCR, CAR, etc.), anticuerpos, anticuerpos biespecíficos y conjugados anticuerpo-fármaco, etc. La divulgación también proporciona dominios de unión a antígeno novedosos con al menos 75% (*p.ej.*, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) de identidad de secuencia de aminoácidos en la región marco con los dominios de unión a antígeno novedosos (*p.ej.*, scFv, vL, vH, vHH, etc.) proporcionados en las **Tablas 3 y 5**. La divulgación también proporciona nuevos dominios de unión a antígeno con hasta 2 diferencias de aminoácidos (es decir, 1, 2) en cada una de las CDR de los nuevos dominios de unión a antígeno (*p. ej.*, scFv, vL, vH, vHH, etc.) proporcionados en las **Tablas 3 y 5**. Las regiones determinantes complementarias de cadena ligera 1-3 (vL, vH, vHH, etc.) son idénticas en la región marco a los nuevos dominios de unión a antígeno. Las regiones determinantes complementarias de cadena ligera 1-3 (LC-CDR1-3) para estos dominios vL novedosos son las establecidas en cualquiera de los SEQ ID NO: 20989-21015, 41591-41861; 21024-21050, 41862-42132; y 21059-21085, 42133-42403. Las regiones determinantes complementarias 1-3 de la cadena pesada (HC-CDR1-3) son las establecidas en cualquiera de los SEQ ID NO: 21094-21120 y 42404-42674; 21129-21155, 42675-42945; y 21164-21190, 42946-43216. Los CDR1-3 para los nuevos dominios vHH se proporcionan en SEQ ID NO: 43304-43318. Los SAR de ejemplo que comprenden estos nuevos dominios de unión a antígeno se proporcionan en SEQ ID NO: 3303-3929, 19823-21960, 33860-40139 y 40173-40427.

[0063] La divulgación proporciona nuevos dominios variables de TCR (**Tabla 4**) que pueden utilizarse en la construcción de SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR) de la divulgación. En la **Tabla 12** de la solicitud de patente provisional se proporcionan ejemplos de uTCR-SAR que

comprenden estos dominios variables de TCR. En una realización, los dominios variables TCR pueden unirse al complejo péptido/MHC independientemente de los coreceptores. En una realización, los dominios variables del TCR pueden unirse al complejo péptido/MHC independientemente de CD8a, CD8b o CD4. En una realización, los dominios variables del TCR pueden unirse al complejo péptido/MHC con mayor afinidad que un TCR natural. En una realización, las regiones variables del TCR comprenden enlaces disulfuro exógenos. En una realización, la divulgación proporciona un SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR) que puede unirse al complejo péptido/MHC independientemente de los coreceptores. En una realización, el SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR) puede unirse al complejo péptido/MHC independientemente de CD8a, CD8b o CD4. En una realización, el SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR) comprende regiones variables del TCR que comprenden enlaces disulfuro exógenos. En una realización, el SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR) comprende regiones constantes del TCR que comprenden enlaces disulfuro exógenos. En una realización, el SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR) comprende mutaciones que dan lugar a residuos de cisteína en los dominios variables del TCR que dan lugar a la formación de enlaces disulfuro exógenos. En una realización, los enlaces disulfuro exógenos son enlaces disulfuro intracadena. En una realización, el SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR) comprende regiones constantes del TCR que comprenden enlaces disulfuro exógenos. En una realización, los enlaces disulfuro exógenos son enlaces disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas constantes del TCR.

[0064] La divulgación proporciona células T $\gamma\delta$ que expresan un SAR de cadena doble o un SAR de cadena y media (*p.ej.*, SIR de cadena doble o SIR de cadena y media) que comprenden dominios de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, scFv, vHH, etc.) que están unidos operativamente a cadenas constantes TCR α y TCR β . En una realización, los SAR (SIR) comprenden cadenas constantes TCR α/β que tienen secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje. En una realización, el SAR (SIR) comprende cadenas constantes TCR α/β que tienen secuencia de aminoácidos de tipo salvaje. En una realización, las cadenas constantes TCR α y TCR β comprenden mutaciones (*p.ej.*, T48C y S57C) que dan lugar a la formación de un segundo enlace disulfuro. En una realización, las cadenas constantes TCR α y TCR β comprenden mutaciones que dan como resultado un mejor emparejamiento entre ellas y un emparejamiento reducido con las cadenas constantes TCR α y/o TCR β endógenas. En una realización, las cadenas constantes TCR α y TCR β del SAR (*p.ej.*, SIR) comprenden residuos de aminoácidos murinos que dan como resultado una mejor expresión. En una realización, las cadenas constantes TCR α y TCR β del SAR son de origen murino. En una realización, las cadenas constantes TCR α y TCR β del SAR tienen delecciones (*p.ej.*, delecciones N-terminales de 1-60 aminoácidos

[0065] La divulgación proporciona células T $\gamma\delta$ que expresan un SAR de cadena doble o un SAR de cadena y media (*p.ej.*, SAR de cadena doble o SAR de cadena y media) que

comprenden dominios de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, scFv, vHH, etc.) que están unidos operativamente a cadenas constantes TCR híbridas. (*p.ej.*, cadenas constantes TCR α y TCR β híbridas o cadenas TCR γ y TCR δ híbridas). En una realización, el SAR (SIR) comprende cadenas constantes híbridas TCR α/β o TCR γ/δ que tienen secuencias de ácido nucleico de tipo salvaje de las cadenas constantes TCR α/β o TCR γ/δ . En una realización, el SAR (SIR) comprende cadenas constantes TCR α/β híbridas o cadenas constantes TCR γ/δ híbridas que tienen secuencia de aminoácidos de tipo salvaje. En una realización, las cadenas constantes TCR α y TCR β híbridas comprenden mutaciones (*p.ej.*, T48C y S57C) que dan lugar a la formación de un segundo enlace disulfuro. En una realización, las cadenas constantes TCR α y TCR β híbridas comprenden mutaciones que dan lugar a su mejor emparejamiento entre sí y a un emparejamiento reducido con las cadenas constantes TCR α y/o TCR β endógenas. En una realización, las cadenas constantes TCR α y TCR β híbridas del SAR (*p.ej.*, SIR) comprenden residuos de aminoácidos murinos que dan como resultado una mejor expresión. En una realización, las cadenas constantes TCR α , β , γ o δ híbridas del SAR son de origen murino. En una realización, las cadenas constantes TCR α , β , γ o δ híbridas del SAR se derivan de una especie distinta de la humana (es decir, ratón, gato, perro, mono, etc.). En una realización, las cadenas constantes TCR α , β , γ o δ híbridas del SAR tienen deleciones (*p.ej.*, deleciones N-terminales de 1-60 aminoácidos).

[0066] La divulgación proporciona células T $\gamma\delta$ que expresan un SAR de cadena doble o un SAR de cadena y media (*p.ej.*, SIR de cadena doble o SIR de cadena y media) que comprenden dominios de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, scFv, vHH, etc.) que están unidos operativamente a cadenas constantes TCR γ y TCR δ . En una realización, el SAR (SIR) comprende cadenas constantes TCR γ/δ que tienen secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje. En una realización, el SAR (*p.ej.*, SIR) comprende cadenas constantes TCR γ/δ que tienen secuencia de aminoácidos de tipo salvaje. En una realización, las cadenas constantes TCR γ y TCR δ del SAR tienen deleciones (*p.ej.*, deleciones N-terminales de 1-60 aminoácidos). En una realización, las células T carecen o tienen una expresión reducida de cadenas TCR γ o/y TCR δ endógenas.

[0067] La divulgación proporciona células T $\gamma\delta$ que expresan un SAR de cadena doble o un SAR de cadena y media (*p.ej.*, SIR de cadena doble o SIR de cadena y media) que comprenden dominios de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, scFv, vHH, etc.) que están unidos operativamente a cadenas constantes pre-TCR α y TCR β . En una realización, los SAR (SIR) comprenden cadenas constantes pre-TCR α y TCR β que tienen secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje. En una realización, el SAR (SIR) comprende cadenas constantes pre-TCR α y TCR β que tienen secuencia de aminoácidos de tipo salvaje. En una realización, las cadenas constantes

pre-TCR α y TCR β del SAR tienen deleciones (*p.ej.*, deleciones N-terminales de 1-60 aminoácidos). En una realización, las células T carecen o tienen una expresión reducida de cadenas TCR pre-TCR α o/y TCR β endógenas.

[0068] En una realización, las células T $\gamma\delta$ que expresan el SAR (*p.ej.*, SIR o NK-SAR) se derivan de células madre embrionarias. En una realización, las células T $\gamma\delta$ que expresan el SAR (*p.ej.*, SIR o NK-SAR) se derivan de células madre embrionarias pluripotentes inducidas (iPSC). En una realización, las células $\gamma\delta$ T que expresan el SAR (*p.ej.*, SIR o NK-SAR) se derivan de la sangre del cordón. En una realización, las células T $\gamma\delta$ que expresan el SAR (*p.ej.*, SIR o NK-SAR) se derivan de un donante. En una realización, el donante es un donante autólogo. En una realización, el donante es un donante alogénico.

[0069] La divulgación proporciona células T $\alpha\beta$ que expresan un SAR de cadena doble o un SAR de cadena y media (*p.ej.*, SIR de cadena doble o SIR de cadena y media) que comprenden dominios de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, scFv, vHH, etc.) que están unidos operativamente a cadenas constantes TCR γ y TCR δ . En una realización, el SAR (SIR) comprende cadenas constantes TCR γ/δ que tienen secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje. En una realización, el SAR (SIR) comprende cadenas constantes TCR γ/δ que tienen secuencia de aminoácidos de tipo salvaje. En una realización, las cadenas constantes TCR γ y TCR δ del SAR tienen deleciones (*p.ej.*, deleciones N-terminales de 1-60 aminoácidos). En una realización, el SAR (SIR) comprende cadenas constantes TCR α/β o TCR γ/δ híbridas. En una realización, las células T $\alpha\beta$ carecen o tienen expresión reducida de cadenas TCR α o/y TCR β endógenas.

[0070] En una realización, las células T $\alpha\beta$ que expresan el SAR (*p.ej.*, SIR o NK-SAR) se derivan de células madre embrionarias. En una realización, las células $\alpha\beta$ T que expresan el SAR (*p.ej.*, SIR o NK-SAR) derivan de células madre embrionarias pluripotentes inducidas (iPSC). En una realización, las células T $\alpha\beta$ que expresan el SAR (*p.ej.*, SIR o NK-SAR) se derivan de sangre de cordón umbilical. En una realización, las células T $\alpha\beta$ que expresan el SAR (*p.ej.*, SIR o NK-SAR) proceden de un donante. En una realización, el donante es un donante autólogo. En una realización, el donante es un donante alogénico.

[0071] La divulgación también proporciona células madre embrionarias (*p.ej.*, iPSC) que expresan uno o más SAR (*p.ej.*, SIR, NK-SAR, uTCR-SAR) de la divulgación. La divulgación también proporciona células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ derivadas de células madre embrionarias (*p.ej.*, iPSC) que expresan uno o más SAR (*p.ej.*, SIR, NK-SAR, uTCR-SAR) de la divulgación. En una realización, las células madre embrionarias (*p.ej.*, iPSC) carecen o tienen expresión reducida de una o más cadenas TCR endógenas. En una realización, las células madre embrionarias (*p.ej.*, iPSC) carecen o tienen expresión reducida de β 2M y/o moléculas HLA.

[0072] La divulgación también proporciona células NK, células NKT, células NK derivadas del cordón umbilical, células T derivadas del cordón umbilical, células madre derivadas del cordón umbilical que expresan cualquiera de los SAR (*p.ej.*, SIR, HC-SAR, zSIR, zCD16-SIR, uTCR-SAR, etc.) descritos en esta divulgación.

[0073] En una realización, las células que expresan SAR (*p.ej.*, células iPSC, NK, T, NKT, CD34+, etc.) carecen o tienen una expresión reducida de TNF α , IL1 α , IL1 β y/o IFN γ . En una realización, las células que expresan SAR (*p.ej.*, iPSC, NK, T, NKT, células CD34+, etc.) carecen o tienen una alteración genética de los genes TNF α , IL1 α , IL1 β y/o IFN γ . En una realización, las células que expresan SAR (*p.ej.*, iPSC, NK, T, NKT, células CD34+, etc.) sobreexpresa CD47 y/o un receptor Fc (*p.ej.*, CD64, CD16). En una realización, las células que expresan SAR (*p.ej.*, iPSC, células NK, T, NKT, CD34+, etc.) expresan un SAR basado en CD16 o CD64 (es decir, un SAR que comprende un dominio de unión a antígeno exógeno unido a una cadena CD64 o CD16 que comprende el dominio extracelular, el dominio bisagra, el dominio transmembrana y, opcionalmente, el dominio citosólico de CD64 o CD16. En las **Tablas 9 y 10** de la solicitud de patente provisional se proporcionan ejemplos de CD16-SAR. Ejemplos de SAR basados en CD64 se han descrito en el documento WO2022178367, que se incorpora por referencia en el presente documento. Alternativamente, el SAR basada en CD64 puede generarse sustituyendo la cadena de señalización CD16 en las SAR descritas en las **Tablas 9 y 10** de la solicitud de patente provisional por una cadena de señalización CD64 (SEQ ID NO: 900-901 o SEQ ID NO (PRT): 9280-81).

[0074] La divulgación también proporciona células T reguladoras (Tregs) que expresan uno o más SARs (*p.ej.*, SIR, NK-SAR, uTCR-SAR) de la divulgación. En una realización, las Tregs sobreexpresa Fox3P. La divulgación proporciona que las Tregs que expresan los SARs de la divulgación pueden usarse para modular la respuesta inmune. En una realización, las Tregs que expresan los SARs de la divulgación (*p.ej.*, un SAR dirigido a la molécula HLA) pueden utilizarse para mejorar la tolerancia al trasplante en un sujeto al que se le ha administrado un injerto con HLA incompatible. En una realización, las Tregs que expresan los SARs de la divulgación pueden usarse para modular la respuesta inmune en un sujeto con trastorno autoinmune (*p.ej.*, enfermedad inflamatoria intestinal o esclerosis múltiple, etc.).

[0075] La divulgación proporciona nuevas proteínas de la envoltura viral para el pseudotipado de vectores lentivirales. Algunos ejemplos de proteínas de envoltura viral son la envoltura de babuino modificada (mBaEV) y las proteínas de envoltura de HERV-W1 modificadas. Estas proteínas de envoltura viral pueden utilizarse para la transducción de células difíciles de infectar, como las células NK y las células madre CD34+ve. En una realización, las proteínas de la envoltura viral pueden utilizarse para la administración *in vivo* de ácidos

nucleicos sin provocar una respuesta inmunitaria significativa. La divulgación proporciona que la combinación de dos virus pseudotipados diferentes se puede utilizar para mejorar la transducción de genes en las células. La divulgación también proporciona nuevas glicoproteínas de envoltura (*p.ej.*, SEQ ID NO: 8539 y 8450-8476) que pueden utilizarse para transducir células sin activación previa o pre-estimulación. Las glicoproteínas de envoltura viral novedosas de ejemplo se proporcionan en SEQ ID NO 70-96, 98, 115-122, 145, 159 y SEQ ID NO (PRT): 8539 y 8450-8476, 8525, 8539.

[0076] La divulgación proporciona líneas celulares que expresan de forma estable genes informadores (*p.ej.*, luciferasa marina y luciferasa de escarabajo termoestables, etc.) que se hacen incompetentes para la replicación mediante tratamiento, pero que pueden utilizarse para medir la citotoxicidad utilizando el ensayo Matador o el ensayo de citotoxicidad Matador-Glo. En una realización, las líneas celulares se hacen competentes para la replicación mediante tratamiento con mitomicina-C. En una realización, las líneas celulares se hacen competentes para la replicación mediante tratamiento con irradiación. En una realización, las líneas celulares se hacen competentes para la replicación mediante tratamiento con irradiación ionizante.

[0077] Un SAR de la divulgación puede expresarse en cualquier célula de mamífero y ser funcionalmente activo. En una realización, la célula de mamífero es una célula T, una célula NK, un macrófago, un granulocito, etc. En una realización, la célula es una célula derivada del cordón umbilical. En una realización, la célula es una célula T, una célula NK, una célula NKT o una célula madre derivada del cordón umbilical. En algunas realizaciones de cualquiera de las células de mamífero descritas en el presente documento, la célula de mamífero se selecciona del grupo de: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula T ingenua, una célula madre T, una célula Treg, una célula T asesina natural (NKT), iNKT (célula asesina natural innata), una célula NK, una célula g-NK, células NK con memoria, células asesinas inducidas por citocinas (CIK), células NK derivadas de iPSC, células T α/β , células T γ/δ , células T derivadas de iPSC, células B, macrófagos/monocitos, iPSC. En algunas realizaciones de cualquiera de las células de mamífero descritas en el presente documento, la célula de mamífero se selecciona del grupo que consiste en una iPSC (célula madre pluripotente inducida), una célula madre embrionaria y una célula madre hematopoyética que puede dar lugar a una célula efectora inmunitaria (*p.ej.*, una célula T, una célula NK o una célula NKT). En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una línea celular inmortalizada, como NK92, NK92MI, YTS o un derivado de la misma. En algunas realizaciones de cualquiera de las células de mamífero descritas en el presente documento, la célula de mamífero es una célula de mamífero obtenida de un sujeto. En algunas realizaciones de cualquiera de las células de mamífero descritas en el presente documento, al sujeto se le diagnostica o identifica un cáncer o

una enfermedad autoinmune (*p.ej.*, lupus, esclerosis múltiple, etc.). En algunas realizaciones de cualquiera de las células de mamífero descritas en el presente documento, el sujeto es humano. En algunas realizaciones, la célula es autóloga. En algunas realizaciones, la célula es alogénica. En el documento PCT/US19/035096, que se incorpora por referencia en el presente documento, se proporcionan ejemplos de enfermedades a las que puede dirigirse el SAR dirigido a un antígeno de la invención.

[0078] También se proporcionan SAR (*p. ej.*, uTCR-SAR, HC-SAR, zCD16-SAR, etc.) que pueden expresarse funcionalmente en células distintas de las células T, incluidas, entre otras, células NK, monocitos, macrófagos, células dendríticas, granulocitos, células madre, células madre embrionarias y/o iPSC. En una realización, la célula que expresa el SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR, HC-SAR, zCD16-SAR, etc.) está diseñada para expresar un coreceptor. En una realización, el coreceptor es CD8a, CD8b o CD4. En una realización, la célula sobreexpresa una molécula CD8 quimérica. En una realización, la célula sobreexpresa una molécula quimérica CD8a/CD8b. En una realización, la célula sobreexpresa una molécula quimérica CD8/CD4. En una realización, la célula que expresa el SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR, HC-SAR, zCD16-SAR, etc.) está diseñada para expresar IL12 o proteína de fusión de IL12 (*p.ej.*, IL12f o IL12f anclada a membrana). En una realización, la célula carece de expresión de β 2M, MHC clase I y clase II y HLA-E. En una realización, la célula sobreexpresa CD47 y un receptor Fc (*p.ej.*, CD64). En una realización, la célula tiene una mutación en el gen de la calreticulina. En una realización, la célula tiene una alteración genética o expresión reducida de los genes TNF α , IL1 α , IL1 β , IL6, IFN α , IFN β , y/o IFN γ . En una realización, la célula expresa IL2, IL7 o IL15, opcionalmente en una forma unida a la membrana.

[0079] También se proporcionan polipéptidos que codifican cualquiera de los SAR descritos en el presente documento.

[0080] También se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de las células de mamífero descritas en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan kits que incluyen cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento.

[0081] También se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento que codifican cualquiera de los SAR de cadena simple, cadena doble y cadena múltiple y/o módulos accesorios descritos en el presente documento, o cualquiera de los conjuntos de ácidos nucleicos descritos en el presente documento que codifican conjuntamente cualquiera de los SAR de cadena simple, cadena doble y cadena múltiple y/o módulos accesorios descritos en el presente

documento, y un portador farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan kits que incluyen cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento.

[0082] En algunas realizaciones, se proporciona un método para matar una célula diana que presenta uno o más antígenos diana, que comprende contactar la célula diana con una célula efectora que expresa un SAR según cualquiera de los SAR (como SAR aislados) descritos anteriormente, en el que el SAR se une específicamente a uno o más antígenos diana.

[0083] En algunas realizaciones, según cualquiera de los métodos para matar una célula diana descritos anteriormente, el contacto es *in vivo*. En algunas realizaciones, el contacto es *in vitro*.

[0084] En alguna realización, se proporcionan métodos para la detección, aislamiento, purificación, expansión, enriquecimiento y eliminación de células que expresan cualquiera de los SAR descritos en el presente documento.

[0085] También se proporcionan en el presente documento métodos para generar una célula que exprese un SAR de cadena simple, doble y multicadena y/o módulos accesorios que incluyen introducir en una célula de mamífero cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento que codifican cualquiera de los SAR y módulos accesorios descritos en el presente documento, o cualquiera de los conjuntos de ácidos nucleicos descritos en el presente documento que codifican cualquiera de los SAR multicadena descritos en el presente documento.

[0086] También se proporcionan en el presente documento métodos para tratar o prevenir una enfermedad (*p.ej.*, cáncer, infección, alergia, trastorno autoinmune, etc.) en un sujeto que incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las células de mamífero descritas en el presente documento. La divulgación también proporciona un método que comprende administrar una molécula SAR, una célula que expresa una molécula SAR o una célula que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula SAR a un sujeto. En una realización, el sujeto tiene un trastorno descrito en el presente documento, *p.ej.*, el sujeto tiene cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad alérgica, enfermedad degenerativa o enfermedad autoinmune, que expresa un antígeno diana descrito en el presente documento. En una realización más, el sujeto tiene un mayor riesgo de padecer un trastorno descrito en el presente documento, *p.ej.*, el sujeto tiene un mayor riesgo de cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad alérgica, enfermedad degenerativa o enfermedad autoinmune (*p.ej.*, lupus, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, enfermedad inflamatoria intestinal, etc.), que expresa un antígeno diana descrito en el presente documento.

[0087] En algunas realizaciones de cualquiera de las SAR descritas en el presente documento, el dominio de unión a antígeno heterólogo se selecciona del grupo de: un

anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (vL, vH, Fab, etc.) un scFv, un (scFv)₂, un dominio VHH, FHVH (un dominio vH totalmente humano), un anticuerpo de dominio único, un andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina (*p.ej.*, centyrina, afibodina, dominio ZIP, un adaptador, etc.), un dominio VNAR, un ligando, un TCR, un dominio variable (Va, Vb, Vg, Vd) de un TCR y un receptor.

[0088] En algunas realizaciones de cualquiera de los SAR descritos en el presente documento, la región heteróloga de unión a antígeno se une específicamente a un único antígeno. En algunas realizaciones de cualquiera de los SAR de cadena única descritos en el presente documento, el antígeno único es un antígeno tumoral. En algunas realizaciones de cualquiera de los SAR descritos en el presente documento, el antígeno tumoral se selecciona de entre un antígeno enumerado en la **Tabla B**.

[0089] También se proporcionan en el presente documento células de mamífero que incluyen cualquiera de los vectores descritos en el presente documento.

[0090] También se proporcionan en el presente documento métodos para generar una célula que exprese SAR, el método comprende introducir en una célula de mamífero cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o cualquiera de los vectores descritos en el presente documento.

[0091] En otra o más realizaciones de cualquiera de las anteriores, la célula inmunitaria o célula madre de cualquiera comprende una pluralidad de polipéptidos SAR. En una realización, la pluralidad de polipéptidos SAR se basa en diferentes arquitecturas SAR (*p.ej.*, esqueletos), como SIR, CAR, zSIR, uTCR-SAR, TFP, etc. En otra o más realizaciones de cualquiera de las anteriores, al menos un polipéptido SIR de la pluralidad de polipéptidos SAR (*p.ej.*, un SIR) se dirige a un antígeno diferente que al menos otro polipéptido SAR. En algunas realizaciones, uno de los SAR se dirige a un antígeno expresado en células sanguíneas (*p.ej.*, CD19, CD20, CD22, BCMA, etc.) y un segundo SAR se dirige a un antígeno expresado preferentemente en células tumorales sólidas (*p.ej.*, PSMA, Her2, MSLN, etc.). En otra realización de cualquiera de las anteriores, al menos un polipéptido SAR de la pluralidad de polipéptidos SAR se dirige al mismo antígeno. En otra o más realizaciones de cualquiera de las anteriores, al menos un polipéptido SAR de la pluralidad de polipéptidos SAR comprende una afinidad de unión al antígeno diferente de la de al menos otro polipéptido SAR. En otra o más realizaciones de cualquiera de las anteriores, la célula inmunitaria comprende además al menos un SAR que codifica un SIR o zSIR o Ab-TCR y un segundo SAR que codifica un polipéptido receptor de antígeno quimérico (CAR). En otra realización de cualquiera de las anteriores, el dominio de unión a antígeno del primer polipéptido SAR se dirige a un antígeno diferente del dominio de unión a antígeno del polipéptido CAR. En otra o más realizaciones de cualquiera de las

anteriores, el polipéptido CAR comprende un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización coestimulador, pero no comprende un dominio de señalización primario o comprende un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización primario, pero no comprende un dominio de señalización coestimulador. En otra o más realizaciones de cualquiera de las anteriores, el polipéptido CAR comprende un dominio de señalización coestimulador que comprende un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en 4-1BB, CD28, CD27 u OX-40, o la molécula CAR comprende un dominio de señalización primario que comprende un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En otra o más realizaciones de cualquiera de las anteriores, el polipéptido CAR es un polipéptido CAR inhibidor, en el que el polipéptido CAR inhibidor comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula inhibidora, en el que la molécula inhibidora se selecciona del grupo que consiste en: PDL, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, TGFR beta, CEACAM-1, CEACAM-3, y CEACAM-5. En otra o más realizaciones de cualquiera de las anteriores, el polipéptido CAR comprende además un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización primario y/o un dominio de señalización intracelular, en el que el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización primario que comprende el dominio funcional de CD3 zeta y un dominio de señalización coestimulador que comprende el dominio funcional de 4-1BB o CD28 o ambos.

[0092] También se proporcionan en el presente documento métodos para tratar un cáncer o una enfermedad autoinmune en un sujeto que incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las células de mamífero descritas en el presente documento. Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen, además, antes del paso de administración, obtener una célula inicial del sujeto; e introducir cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o cualquiera de los vectores descritos en el presente documento en la célula inicial, para producir la célula de mamífero que se administra al sujeto. Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen, además, entre la etapa de introducción y la etapa de administración, una etapa de cultivo de la célula que se administra al sujeto en un medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones, las células que expresan SAR-T se generan *in vivo*. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos aquí descritos, el sujeto es humano.

[0093] En algunas realizaciones, las células se exponen a un agente que mejora su eficacia y/o seguridad. En una realización, el agente se selecciona entre un inhibidor de tirosina cinasa,

p.ej., inhibidor de Src cinasa, *p.ej.*, inhibidor de Lck, *p.ej.*, Dasatinib, Ponatinib, un inhibidor de JAK/STAT (*p.ej.*, Ruxolitinib), un inhibidor de mTOR o un anticuerpo activador de células T o NK biespecífico o multiespecífico (*p. ej.*, BiTE, BiKE, TriKE, etc.), o un anticuerpo CSF1R. En algunas realizaciones, las células se exponen al agente *in vitro*. En algunas realizaciones, las células se exponen al agente *in vivo*. En algunas realizaciones, el sujeto se administra el agente antes, simultáneamente o después de la administración de las células que expresan el SAR. En algunas realizaciones, el sujeto se administra el agente antes, simultáneamente o después de la administración de un vector que expresa un SAR. En algunas realizaciones, el sujeto recibe una dosis de los agentes, mientras que, en otras realizaciones, el sujeto recibe múltiples dosis del agente.

[0094] En algunas realizaciones de cualquiera de los SAR multicadena descritos en el presente documento, el SAR carece de un ITAM, pero recluta una proteína de señalización que comprende un dominio estimulador primario que contiene un ITAM. En algunas realizaciones, el SAR recluta una proteína de señalización seleccionada del grupo de CD3z, FcR γ , DAP10 y DAP12.

[0095] En algunas realizaciones, se proporciona un método para fabricar una célula T que exprese un receptor de antígeno sintético de cadena híbrida (HC-SAR) o un SAR híbrido. El método puede comprender poner en contacto una célula T con un primer ácido nucleico que codifica un primer dominio de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, scFv, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, adaptador, epítipo, receptor o ligando, etc.) que está unido operativamente mediante un enlazador opcional a una primera cadena constante de TCR híbrida en la que la primera cadena de TCR híbrida comprende un primer dominio transmembrana de cadena de TCR y un segundo dominio constante de cadena de TCR pero no comprende un primer dominio constante de cadena de TCR. El método puede comprender poner en contacto la célula T con un segundo ácido nucleico que codifica un segundo dominio de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, scFv, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, adaptador, epítipo, receptor o ligando, etc.) que está unido operativamente mediante un enlazador opcional a una segunda cadena TCR híbrida, en la que la segunda cadena TCR híbrida comprende un dominio transmembrana de segunda cadena, y un primer dominio constante de cadena TCR, pero no comprende un segundo dominio constante de cadena TCR. En una realización, el dominio de unión a antígeno no-TCR unido operativamente a la primera cadena constante TCR híbrida es el fragmento vL de un anticuerpo y el dominio de unión a antígeno no-TCR unido operativamente a la segunda cadena constante TCR híbrida es el fragmento vH complementario de dicho anticuerpo. En una realización, los fragmentos vL y vH

pueden formar un módulo de unión a antígeno similar al Fv que se une específicamente a un antígeno diana.

[0096] En algunas realizaciones, se proporciona un método de fabricación de una célula T que expresa un Receptor de Antígeno Sintético de cadena híbrida (HC-SAR) o un SAR híbrido. El método puede comprender contactar una célula T con un primer ácido nucleico que codifica una primera cadena constante TCR híbrida en la que la primera cadena TCR híbrida comprende un primer dominio transmembrana de cadena TCR, un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo (vL) y un segundo dominio constante de cadena TCR, pero no comprende un primer dominio constante de cadena TCR. El método puede comprender poner en contacto la célula T con un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena TCR híbrida, en la que la segunda cadena TCR híbrida comprende un segundo dominio transmembrana de cadena, un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo (vH) y un primer dominio constante de cadena TCR, pero no comprende un segundo dominio constante de cadena TCR. El primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vL y el primer dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena alfa o gamma y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o gamma y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vH y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta o delta y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o delta; o el primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vH y el primer dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena alfa o delta y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o delta y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vL y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta o gamma y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o gamma. Como tal, el método puede comprender configurar la célula T para expresar un HC-SAR que comprende la primera cadena híbrida y la segunda cadena híbrida. En algunas realizaciones, la primera cadena híbrida comprende además un segundo péptido de conexión de cadena y la segunda cadena híbrida puede comprender además un primer péptido de conexión de cadena, en el que el primer péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena alfa o gamma y el segundo péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena beta o delta, o en el que el primer péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena alfa o delta y el segundo péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena beta o gamma. En algunas realizaciones, el primer

dominio variable de cadena comprende un dominio variable vL y el primer dominio constante de cadena comprende un dominio constante de cadena alfa y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena beta y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio variable vH y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena alfa. En algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio variable vL y el primer dominio constante de cadena comprende un dominio constante de cadena gamma y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena gamma y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio vH y el segundo dominio constante de cadena comprende un dominio constante de cadena delta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena delta. En algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio variable vL y el primer dominio constante de cadena comprende un dominio constante de cadena alfa y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena gamma y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio variable vH y el segundo dominio constante de cadena comprende un dominio constante de cadena beta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena delta. En algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio vL y el primer dominio constante de cadena comprende un dominio constante de cadena alfa y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena delta y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio variable vH y el segundo dominio constante de cadena comprende un dominio constante de cadena beta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena gamma. Debe entenderse que los dominios vL y vH en las construcciones anteriores pueden sustituirse de modo que la primera cadena puede comprender el dominio vH y la segunda cadena puede comprender el dominio vL complementario. Además, uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) tales como vHH, FHVH, Darpin, centyrina, adaptador, receptor, ligando, etc. pueden unirse al N-terminal o cerca del N-terminal de los dominios vL y/o vH del SIR híbrido de doble cadena. En las **Tablas 16-18** de la solicitud de patente provisional se proporcionan varios ejemplos de SIR uniespecíficos, biespecíficos y universales dirigidos a diferentes antígenos.

[0097] En algunas realizaciones, se proporciona un método de fabricación de una célula T que expresa un receptor de antígeno sintético de cadena híbrida o un SAR híbrido. El método puede comprender poner en contacto una célula T con un primer ácido nucleico que codifica un

dominio de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, scFv, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, adaptador, epítipo, receptor o ligando, etc.) que está unido operativamente mediante un enlazador opcional a una primera cadena constante de TCR híbrida en la que la primera cadena de TCR híbrida comprende un primer dominio transmembrana de cadena de TCR que es un híbrido de dos cadenas de TCR (*p.ej.*, TCR α y TCR δ o TCR β y TCR γ) y un segundo dominio constante de cadena de TCR. El método puede comprender poner en contacto la célula T con un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena TCR híbrida, en la que el segundo dominio transmembrana de cadena TCR híbrida es un híbrido de dos cadenas TCR (*p.ej.*, TCR α y TCR δ o TCR β y TCR γ).

[0098] El método puede comprender el contacto de una célula T con un primer ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno no-TCR (*p. ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, scFv, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, adaptador, epítipo, receptor o ligando, etc.) que está unido operativamente mediante un enlazador opcional a una primera cadena constante de TCR híbrida en la que la primera cadena de TCR híbrida comprende un primer dominio transmembrana de cadena de TCR que es un híbrido de dos cadenas de TCR (*p.ej.*, TCR α y TCR δ o TCR β y TCR γ) y un segundo dominio constante de cadena de TCR. El método puede comprender poner en contacto la célula T con un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena TCR híbrida, en la que el segundo dominio transmembrana de cadena TCR híbrida es un híbrido de dos cadenas TCR (*p.ej.*, TCR α y TCR δ o TCR β y TCR γ).

[0099] En algunas realizaciones, se proporciona un método para fabricar una célula inmunitaria (*p.ej.*, una célula T) que exprese un receptor de antígeno sintético de cadena híbrida (HC-SAR) o un SAR híbrido. El método puede comprender poner en contacto una célula T con un primer ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, scFv, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, adaptador, epítipo, receptor o ligando, etc.) que está unido operativamente mediante un enlazador opcional a una primera cadena constante de TCR híbrida en la que la primera cadena de TCR híbrida comprende un primer dominio transmembrana de cadena de TCR y un segundo dominio similar a Ig de cadena TCR pero no comprende un primer dominio similar a Ig de cadena TCR. El método puede comprender poner en contacto la célula T con un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena TCR híbrida (o híbrida), en la que la segunda cadena TCR híbrida comprende un segundo dominio transmembrana de cadena, un dominio de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, scFv, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, adaptador, epítipo, receptor o ligando, etc.) y un primer dominio similar a Ig de cadena TCR, pero no comprende un segundo dominio constante de cadena TCR. En una realización, el vL de la primera cadena TCR híbrida y el vH de la segunda cadena TCR híbrida interactúan para

formar un fragmento variable (Fv) que puede unirse específicamente a un antígeno diana cuando se expresa en la superficie de una célula inmunitaria (*p.ej.*, célula T). En una realización, una célula inmunitaria que expresa el SAR híbrido puede iniciar una vía de transducción de señales cuando se expone a una célula que expresa el antígeno diana. En una realización, una célula inmunitaria que expresa el SAR híbrido puede iniciar la activación celular, la diferenciación, la proliferación, la secreción de citocinas y/o la citotoxicidad cuando se expone a una célula que expresa el antígeno diana.

[00100] En una realización, el SAR con las cadenas de TCR híbridas muestran una mayor expresión en la superficie celular cuando se expresan en una célula inmunitaria (*p.ej.*, célula T) en comparación con un cTCR que comprende secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de cadenas TCR de tipo salvaje pero que comprende los dominios de unión a antígeno idénticos. En una realización, el SAR con las cadenas de TCR híbridas muestra al menos un 5% (*p.ej.*, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, etc.) de mayor expresión en la superficie celular cuando se expresa en una célula inmunitaria (*p.ej.*, célula T) en comparación con un cTCR que comprende secuencias de ácido nucleico y aminoácido de cadenas TCR de tipo salvaje pero que comprende los dominios de unión a antígeno idénticos. La expresión del TCR de cadena híbrida y del cTCR se mide mediante técnicas conocidas en la técnica, como la tinción con proteína L y/o el ensayo Topanga.

[00101] En una realización, el SAR con las cadenas TCR híbridas muestran un emparejamiento de cadenas reducido con las cadenas TCR endógenas cuando se expresan en una célula inmunitaria (*p.ej.*, célula T) en comparación con un cTCR o un SIR que comprenden los dominios de unión a antígeno idénticos. En una realización, el SIR con las cadenas TCR híbridas muestran al menos un 5% (*p.ej.*, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, etc.) menos de emparejamiento de cadenas con cadenas TCR endógenas cuando se expresan en una célula inmunitaria (*p.ej.*, célula T) en comparación con un cTCR y/o un SIR que comprenden los dominios de unión a antígeno idénticos.

[00102] En una realización, el SAR con las cadenas TCR híbridas muestran una mayor activación celular, diferenciación, proliferación, secreción de citocinas y/o citotoxicidad cuando se expresan en una célula inmunitaria (*p.ej.*, célula T) en comparación con un cTCR que comprende secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de cadenas TCR de tipo salvaje pero que comprende los dominios de unión a antígeno idénticos. En una realización, el SAR con las cadenas TCR híbridas muestra al menos un 5% (*p.ej.*, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, etc.) más de activación celular, diferenciación, proliferación, secreción de citocinas y/o citotoxicidad cuando se expresa en una célula inmunitaria (*p.ej.*, célula T) en comparación con un cTCR que comprende secuencias de ácido

nucleico y aminoácido de cadenas TCR de tipo salvaje pero que comprende los dominios de unión a antígeno idénticos. La activación celular, la diferenciación, la proliferación, la secreción de citocinas y la citotoxicidad se miden mediante técnicas conocidas en la técnica, como la citometría de flujo, ELISA y el ensayo de citotoxicidad Matador.

[00103] En algunas realizaciones, se proporciona un método para fabricar una célula T que exprese un receptor de antígeno sintético de cadena híbrida (HC-SAR) o un SAR híbrido. El método puede comprender poner en contacto una célula T con un primer ácido nucleico que codifica una primera cadena constante TCR híbrida (o híbrida) en la que la primera cadena TCR híbrida comprende un primer dominio transmembrana de cadena TCR, un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo (vL) y un segundo dominio similar a Ig de cadena TCR, pero no comprende un primer dominio similar a Ig de cadena TCR. El método puede comprender poner en contacto la célula T con un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena TCR híbrida (o híbrida), en la que la segunda cadena TCR híbrida comprende un segundo dominio transmembrana de cadena, un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo (vH) y un primer dominio similar a Ig de cadena TCR, pero no comprende un segundo dominio similar a Ig de cadena TCR. El primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vL y el primer dominio similar a Ig de cadena puede comprender un dominio similar a Ig de cadena alfa o gamma y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o gamma y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vH y el segundo dominio similar a Ig de cadena puede comprender un dominio similar a Ig de cadena beta o delta y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o delta; o el primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vH y el primer dominio similar a Ig de cadena puede comprender un dominio constante de cadena alfa o delta y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o delta y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vL y el segundo dominio similar a Ig de cadena puede comprender un dominio similar a Ig de cadena beta o gamma y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o gamma. Como tal, el método puede comprender configurar la célula T para expresar un HC-SAR que comprende la primera cadena híbrida y la segunda cadena híbrida. En algunas realizaciones, la primera cadena híbrida comprende además un segundo péptido de conexión de cadena y la segunda cadena híbrida puede comprender además un primer péptido de conexión de cadena, en el que el primer péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena alfa o gamma y el segundo péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena beta o delta, o en el que el

primer péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena alfa o delta y el segundo péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena beta o gamma. En algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio variable vL y el primer dominio constante de cadena comprende un dominio constante de cadena alfa y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena beta y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio variable vH y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena alfa. En algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio variable vL y el primer dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena gamma y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena gamma y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio vH y el segundo dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena delta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena delta. En algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio variable vL y el primer dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena alfa y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena gamma y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio variable vH y el segundo dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena beta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena delta. En algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio vL y el primer dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena alfa y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena delta y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio variable vH y el segundo dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena beta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena gamma. Debe entenderse que los dominios vL y vH en las construcciones anteriores pueden sustituirse de modo que la primera cadena puede comprender el dominio vH y la segunda cadena puede comprender el dominio vL complementario. Además, uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) tales como vHH, FHVH, DARPIN, centyrina, adaptador, receptor, ligando, etc. pueden unirse al N-terminal o cerca del N-terminal de los dominios vL y/o vH del SIR híbrido de doble cadena.

[00104] También se entiende que un SIR multicadena con cadenas TCR híbridas (o híbridas) puede comprender un dominio de unión a antígeno (*p.ej.*, scFV, vHH, FHVH, Darpin, dominio de unión a antígeno no inmunoglobulina, receptor, ligando, autoantígeno, etc.) unido sólo a una

de las cadenas TCR híbridas (o híbridas), que es la coexpresada con la cadena TCR híbrida (o híbrida) complementaria que carece de un dominio de unión a antígeno. Un SIR de cadena híbrida de este tipo se denomina SIR híbrido de cadena y media. Además, uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) tales como vHH, FHVH, DARPIN, centyrina, adaptador, receptor, ligando pueden unirse al N-terminal o cerca del N-terminal del dominio de unión a antígeno del SIR híbrido (o de cadena híbrida). En las **Tablas 19 y 20** de la solicitud de patente provisional se proporcionan varios ejemplos de SIR híbridos de cadena única, biespecíficos y universales que se dirigen a diferentes antígenos.

[00105] En algunas realizaciones, se proporciona un vector de expresión. El vector de expresión puede comprender un primer ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno no-TCR (*p. ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, scFv, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, adaptador, epítipo, receptor o ligando, etc.) que está unido operativamente mediante un enlazador opcional a una primera cadena TCR híbrida (o híbrida) en la que la primera cadena TCR híbrida (o híbrida) comprende un primer dominio transmembrana de cadena TCR y un segundo dominio constante de cadena TCR pero no comprende un primer dominio constante de cadena TCR. El método puede comprender poner en contacto la célula T con un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena TCR híbrida (o híbrida), en la que la segunda cadena TCR híbrida comprende un segundo dominio transmembrana de cadena, un dominio de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, scFv, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, adaptador, epítipo, receptor o ligando, etc.) y un primer dominio constante de cadena TCR, pero no comprende un segundo dominio constante de cadena TCR. En una realización, el vL de la primera cadena TCR híbrida y el vH de la segunda cadena TCR híbrida interactúan cuando se expresan en la superficie de una célula inmunitaria (*p.ej.*, célula T) para formar un fragmento variable (Fv), que puede unirse específicamente a un antígeno diana.

[00106] En algunas realizaciones, se proporciona un vector de expresión. El vector de expresión puede comprender un primer ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno no-TCR (*p. ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, scFv, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, adaptador, epítipo, receptor o ligando, etc.) que está unido operativamente mediante un enlazador opcional a una primera cadena TCR híbrida (o híbrida) en la que la primera cadena TCR híbrida (o híbrida) comprende un primer dominio transmembrana de cadena TCR y un segundo dominio similar a Ig de cadena TCR pero no comprende un primer dominio similar a Ig de cadena TCR. El método puede comprender poner en contacto la célula T con un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena TCR híbrida (o híbrida), en la que la segunda cadena TCR híbrida comprende un segundo dominio transmembrana de cadena, un dominio de unión a antígeno no-TCR y un primer dominio similar a Ig de cadena TCR, pero

no comprende un segundo dominio similar a Ig de cadena TCR. En una realización, el vL de la primera cadena TCR híbrida y el vH de la segunda cadena TCR híbrida interactúan cuando se expresan en la superficie de una célula inmunitaria (*p.ej.*, célula T) para formar un fragmento variable (Fv), que puede unirse específicamente a un antígeno diana.

[00107] El vector de expresión puede comprender un primer ácido nucleico que codifica una primera cadena constante TCR híbrida (o híbrida), en la que la primera cadena TCR híbrida (o híbrida) comprende un primer dominio transmembrana de cadena TCR, un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo (vL) y un segundo dominio similar a Ig de cadena TCR, pero no comprende un primer dominio similar a Ig de cadena TCR. El vector de expresión puede comprender un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena TCR híbrida (o híbrida), en la que la segunda cadena TCR híbrida comprende un segundo dominio transmembrana de cadena, un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo (vH) y un primer dominio similar a Ig de cadena TCR, pero no comprende un segundo dominio similar a Ig de cadena TCR. El primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vL y el primer dominio similar a Ig de cadena puede comprender un dominio similar a Ig de cadena alfa o gamma y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o gamma y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vH y el segundo dominio similar a Ig de cadena puede comprender un dominio similar a Ig de cadena beta o delta y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o delta; o el primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vH y el primer dominio similar a Ig de cadena puede comprender un dominio constante de cadena alfa o delta y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o delta y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vL y el segundo dominio similar a Ig de cadena puede comprender un dominio similar a Ig de cadena beta o gamma y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o gamma. Como tal, el vector de expresión puede comprender un SAR de cadena híbrida que comprende la primera cadena híbrida y la segunda cadena híbrida. En algunas realizaciones, la primera cadena híbrida comprende además un segundo péptido de conexión de cadena y la segunda cadena híbrida puede comprender además un primer péptido de conexión de cadena, en el que el primer péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena alfa o gamma y el segundo péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena beta o delta, o en el que el primer péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena alfa o delta y el segundo péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena beta o gamma. En

algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio variable vL y el primer dominio constante de cadena comprende un dominio constante de cadena alfa y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena beta y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio variable vH y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena alfa. En algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio variable vL y el primer dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena gamma y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena gamma y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio vH y el segundo dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena delta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena delta . En algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio variable vL y el primer dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena alfa y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena gamma y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio variable vH y el segundo dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena beta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena delta. En algunas realizaciones, el primer dominio variable de cadena comprende un dominio vL y el primer dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena alfa y el primer dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena delta y el segundo dominio variable de cadena comprende un dominio variable vH y el segundo dominio similar a Ig de cadena comprende un dominio similar a Ig de cadena beta y el segundo dominio transmembrana de cadena comprende un dominio transmembrana de cadena gamma. Debe entenderse que los dominios vL y vH en las construcciones anteriores pueden sustituirse de modo que la primera cadena puede comprender el dominio vH y la segunda cadena puede comprender el dominio vL complementario. Además, el vector de expresión puede comprender uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) que pueden unirse al N-terminal o cerca del N-terminal de los dominios vL y/o vH del SIR híbrido de doble cadena.

[00108] El vector de expresión puede comprender un primer ácido nucleico que codifica una primera cadena híbrida que comprende un primer dominio transmembrana de cadena, un dominio vL y un segundo dominio constante de cadena. El vector de expresión puede comprender un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena híbrida que comprende un segundo dominio transmembrana de cadena, un dominio vH y un primer dominio constante

de cadena. El primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio vL y el primer dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena alfa o gamma y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o gamma y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio vH y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta o delta y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o delta; o el primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio vL y el primer dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena alfa o delta y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o delta y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio vH y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta o gamma y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o gamma. En algunas realizaciones, la primera cadena híbrida comprende además un segundo péptido conector de cadena pero no un primer péptido conector de cadena, y la segunda cadena híbrida comprende además un primer péptido conector de cadena pero no un segundo péptido conector de cadena, en el que el primer péptido conector de cadena comprende un péptido conector de cadena alfa o gamma y el segundo péptido conector de cadena comprende un péptido conector de cadena beta o delta; o el primer péptido conector de cadena comprende un péptido conector de cadena alfa o delta y el segundo péptido conector de cadena comprende un péptido conector de cadena beta o gamma.

[00109] En algunas realizaciones, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico forman parte del mismo vector de expresión y el vector de expresión comprende además una secuencia codificante de péptidos 2A flanqueada por el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico en la que el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico están dirigidos por un único promotor. En algunas realizaciones, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico forman parte de vectores de expresión separados. Opcionalmente, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico pueden ser impulsados por sus propios promotores separados.

Opcionalmente, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico pueden formar parte de un único vector de expresión y ser impulsados por sus propios promotores separados. En algunas realizaciones, el vector de expresión comprende un vector lentiviral, un vector retroviral, un vector adenoviral o un vector viral adeno-asociado. En algunas realizaciones, el primer y/o el segundo y/o el tercer ácido nucleico que comprende el SAR o el módulo accesorio/control terapéutico es impulsado por la activación de un receptor Notch Sintético (SynNotch) o una

variante del mismo. Los receptores SynNotch se describen en el documento WO2022140159A1, que se incorpora en su totalidad por referencia.

[00110] En algunas realizaciones, se proporciona una célula modificada genéticamente. En una realización, la célula es una célula T. En una realización, la célula es una célula NK, una célula NKT, una célula iNKT, una célula G-NK, un macrófago, un monocito, un granulocito, una célula madre embrionaria, una iPSC o una célula madre hematopoyética. La célula T modificada genéticamente puede comprender un primer ácido nucleico que codifica una primera cadena híbrida que comprende un dominio transmembrana de primera cadena, un dominio vL y un dominio constante de segunda cadena. La célula T modificada genéticamente puede comprender un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena híbrida que comprende un dominio transmembrana de segunda cadena, un dominio vH y un dominio constante de primera cadena. El primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable vL y el primer dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena alfa o gamma y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o gamma y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable de cadena vH y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta o delta y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o delta; o el primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio variable de cadena vH y el primer dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena alfa o delta y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o delta y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio vL y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta o gamma y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o gamma. Como tal, la célula T puede configurarse para expresar un HC-SAR que comprende la primera cadena híbrida y la segunda cadena híbrida. En algunas realizaciones, la primera cadena híbrida comprende además un segundo péptido de conexión de cadena y la segunda cadena híbrida comprende además un primer péptido de conexión de cadena, en el que el primer péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena alfa o gamma y el segundo péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena beta o delta; o en el que el primer péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena alfa o delta y el segundo péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena beta o gamma. En algunas realizaciones, la célula T modificada genéticamente está configurada para expresar la primera cadena híbrida como un primer polipéptido y la segunda cadena híbrida como un segundo polipéptido, en el que la

primera cadena híbrida y la segunda cadena híbrida son moléculas separadas. En algunas realizaciones, la expresión de un TCR endógeno se reprime o elimina en la célula T modificada genéticamente.

[00111] En algunas realizaciones, se proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. El método puede comprender configurar una célula T aislada para expresar una primera cadena híbrida que comprende un dominio transmembrana de primera cadena, un dominio vL, y un dominio constante de segunda cadena, pero no comprende un dominio variable de primera cadena y no comprende un dominio constante de primera cadena. El método puede comprender configurar la célula T aislada para expresar una segunda cadena híbrida que comprende un segundo dominio transmembrana de cadena, un dominio vH, y un primer dominio constante de cadena, pero no comprende un segundo dominio constante de cadena. El primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio vL y el primer dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena alfa o gamma y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o gamma y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio vH y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta o delta y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o delta; o bien el primer dominio variable de cadena puede comprender un dominio vH y el primer dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena alfa o delta y el primer dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena alfa o delta y el segundo dominio variable de cadena puede comprender un dominio vL y el segundo dominio constante de cadena puede comprender un dominio constante de cadena beta o gamma y el segundo dominio transmembrana de cadena puede comprender un dominio transmembrana de cadena beta o gamma. Como tal, la célula T modificada genéticamente configurada para expresar un receptor inmunitario sintético híbrido (HC-SAR) que comprende la primera cadena híbrida y la segunda cadena híbrida puede administrarse al sujeto. En algunas realizaciones, la primera cadena híbrida comprende además un segundo péptido de conexión de cadena y la segunda cadena híbrida puede comprender además un primer péptido de conexión de cadena, en el que el primer péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena alfa o gamma y el segundo péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena beta o delta ; o en el que el primer péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena alfa o delta y el segundo péptido de conexión de cadena comprende un péptido de conexión de cadena beta o gamma. En algunas realizaciones, la célula T aislada es autóloga del sujeto. En algunas realizaciones, la célula T aislada es alogénica del sujeto. En algunas realizaciones, la

célula T comprende una célula T CD4. En algunas realizaciones, la célula T comprende una célula T CD8. En algunas realizaciones, la célula T comprende una célula T reguladora (Treg). En algunas realizaciones, la célula T se coadministra con una segunda población de células T modificadas genéticamente. En algunas realizaciones, la célula T se administra en una dosis única. En algunas realizaciones, la célula T se administra en dosis múltiples. En algunas realizaciones, el sujeto tiene al menos un tumor, un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune y necesita tratamiento para ello. En algunas realizaciones, el sujeto tiene células T disminuidas, ineficaces o agotadas y necesita tratamiento para ello. En algunas realizaciones, se induce a la célula T a expresar una pluralidad de HC-SAR contra una serie de antígenos. En algunas realizaciones, la célula T puede administrarse al sujeto mediante al menos una de las siguientes vías: inyección intramuscular, inyección intravaginal, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, administración epicutánea, administración intradérmica o administración nasal. En algunas realizaciones, la célula T administrada se monitoriza además a lo largo del tiempo. En algunas realizaciones, el método puede repetirse según se desee.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[00112] La Figura 1 muestra imágenes de bioluminiscencia de ratones NSG xenoinjertados con células JEKO-1 y a los que se administraron células T de control o células T que expresaban las construcciones SAR CD79b indicados.

[00113] La Figura 2 muestra imágenes de bioluminiscencia de ratones NSG xenoinjertados con células LNCaP y a los que se administraron células T de control o células T que expresaban las construcciones STEAP2 SAR indicadas.

[00114] La Figura 3 muestra imágenes de bioluminiscencia de ratones NSG xenoinjertados con células NALM6 y a los que se administraron células NK de control o células T que expresaban las construcciones SAR CD19 indicados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00115] A continuación, se describe con más detalle la invención. En los siguientes pasajes, se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos, a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

[00116] Salvo que se indique lo contrario, o resulte implícito del contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados que se indican a continuación. A menos que se indique explícitamente lo contrario, o resulte evidente por el contexto, los términos y frases

siguientes no excluyen el significado que el término o frase ha adquirido en la técnica a la que pertenece. Las definiciones se proporcionan para ayudar a describir realizaciones particulares, y no pretenden limitar la invención reivindicada, ya que el alcance de la invención está limitado únicamente por las reivindicaciones.

[00117] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención.

[00118] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "que comprende" o "comprende" se utiliza en referencia a composiciones, métodos y sus respectivos componentes, que son útiles para una realización, aunque abiertos a la inclusión de elementos no especificados, ya sean útiles o no. Los expertos en la materia entenderán que, en general, los términos utilizados en el presente documento se entienden como términos "abiertos" (*p.ej.*, el término "incluye" debe interpretarse como "incluye, pero no se limita a", el término "tiene" debe interpretarse como "tiene al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "incluye, pero no se limita a", etc.).

[00119] En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con el cultivo de células y tejidos, la patología, la oncología, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en el presente documento son las conocidas y de uso común en la técnica. Los métodos y técnicas de la divulgación se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente especificación a menos que se indique lo contrario. Véase, *p.ej.*, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2013)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con la inmunología, la biología molecular, la química analítica, la química orgánica sintética y la química medicinal y farmacéuticas descritas en el presente documento, así como los procedimientos y técnicas de laboratorio, son los conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración de fármacos y tratamiento de pacientes.

[00120] El término "dominio autónomo de unión a antígeno" o "AABD" se refiere a un dominio de unión a antígeno que puede unirse a un antígeno de forma autónoma, es decir, en ausencia de otro dominio de unión a antígeno. Un ejemplo de AABD es un dominio vH único o un dominio vH autónomo (aVH), típicamente un dominio único vH humano (SVH) que puede unirse a un antígeno en ausencia de un dominio vL. Otro ejemplo de AABD es un dominio vH totalmente humano (FHVH). Otro ejemplo de AABD es un dominio vL único o un dominio vL

autónomo, normalmente un dominio único vL humano (SVL) que puede unirse a un antígeno en ausencia de un dominio vH. AABD también se refiere a otros dominios de unión a antígeno que pueden unirse a un antígeno de forma autónoma. En una realización, el AABD es un dominio de unión a antígeno no basado en scFv. Un ejemplo de dominio de unión a antígeno autónomo no basado en scFv incluye pero no se limita a un dominio vHH, un dominio vHH humanizado, un TCR de dominio variable único (svd-TCR), y un andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina tal como un Darpin, un afibodina, un dominio ZIP (*p. ej.*, RZIP, EZIP, E4, R4, etc.), una afilina, una anectina, una afitina, una obodina, un repebody, un fynomer, una alfabodina, un avimer, un atrimer, una centyrina, una pronectina, una anticalina, un dominio kunitz, una proteína de repetición Armadillo o un fragmento de la misma. Ejemplos adicionales de dominios autónomos de unión a antígeno no basados en el scFv incluyen el dominio de unión a ligando de un receptor (*p. ej.*, CD16-V158A, NKG2D) o un fragmento del mismo, el dominio de unión a receptor de un ligando (*p. ej.*, APRIL, Thrombopoietin, etc.) o un fragmento del mismo, un adaptador (*p. ej.*, RZIP, EZIP, E4, K4, NKG2D-YA, NKG2D-AF, etc.) o un fragmento del mismo, una proteína de unión a un adaptador (*p. ej.*, ULBP2R, ULBP2-S3, etc.) o un fragmento del mismo, un epítipo o una etiqueta (*p. ej.*, Streptag, etiqueta FLAG, etc.), un autoantígeno o un fragmento del mismo y similares.

[00121] La divulgación describía el uso de AABD, como dominios V_H (o vH) humanos, como múltiples dominios V_H humanos, como bloques de construcción para hacer SAR uniespecíficos, biespecíficos y multiespecíficos.

[00122] El término "aproximadamente" cuando se refiere a un valor medible como una cantidad, una duración temporal y similares, se entiende que abarca variaciones de $\pm 20\%$ o en algunos casos $\pm 10\%$, o en algunos casos $\pm 5\%$, o en algunos casos $\pm 1\%$, o en algunos casos $\pm 0.1\%$ del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados o describir las composiciones aquí descritas. Además, cualquier valor o rango (*p. ej.*, menos de 20 o terminología similar) incluye explícitamente cualquier número entero entre dichos valores o hasta el valor. Así, *p. ej.*, "de una a cinco mutaciones" incluye explícitamente 1, 2, 3, 4 y/o 5 mutaciones.

[00123] El término "Ab-TCR" o "AbTCR" se refiere a una plataforma CAR de próxima generación como se describe en el documento WO 2017/070608 A1 que se incorpora al presente documento por referencia.

[00124] El término "módulo accesorio" se refiere a uno o varios de los siguientes PDL1, PDL2, CD80, CD86, crmA, p35, K13-opt, MC159, MyD88-L265P, TCL-1a, 41BBL, CD40L, vFLIP-K13, MC159, cFLIP-L/MRIT α , IgSP-[hTRAC-opt2], IgSP-[hTRBC-opt2], un conmutador polivalente (*p. ej.*, IL2-tBCMA, IL15-tBCMA, IL2-RQR, IL15-RQR, etc.), NKG2C,

CD94, DAP10, DAP12, CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ζ , FcR γ , y una combinación de los mismos que se expresa en una célula inmunitaria (*p.ej.*, célula NK o célula T, *p.ej.*, célula SAR-NK, célula SAR-T o célula TCR-T) para disminuir, regular o modificar la actividad de la célula inmunitaria. En una realización, un módulo accesorio es un control terapéutico (*p.ej.*, icapasa 9). Los SEQ ID NO nucleicos y aminoácidos de varios ejemplos de módulos accesorios y controles terapéuticos se proporcionan en la **Tabla 7** de la solicitud de patente provisional (*p.ej.*, SEQ ID NO: 9038-9047, 9284-9308, 9348-9349). En algunas realizaciones, el módulo accesorio se coexpresa con un receptor inmunitario tal como un SAR o un TCR para aumentar, disminuir, regular o modificar la expresión o actividad de un SAR o un TCR o una célula que expresa un SAR o un TCR.

[00125] El término "anticuerpo", tal y como se utiliza aquí, se refiere a una proteína o secuencia polipeptídica derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, de cadena múltiple o simple, o inmunoglobulinas intactas, y pueden derivarse de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. El anticuerpo puede ser "humanizado", "quimérico", totalmente humano o no humano. Un anticuerpo puede tener un único dominio (*p.ej.*, un único dominio vH).

[00126] El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una porción de un anticuerpo que conserva la capacidad de interactuar específicamente con (*p.ej.*, por unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítipo de un antígeno

[00127] El término "cadena pesada de anticuerpo" se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales, y que normalmente determina la clase a la que pertenece el anticuerpo.

[00128] El término "cadena ligera de anticuerpo" se refiere al más pequeño de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales. Las cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ) son los dos isotipos principales de cadenas ligeras de anticuerpos.

[00129] "Agente anticanceroso" se refiere a agentes que inhiben la división y el crecimiento celular aberrante, inhiben la migración de células neoplásicas, inhiben la invasividad o previenen el crecimiento del cáncer y la metástasis.

[00130] El término "efecto anticancerígeno" o "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por diversos medios, entre ellos, una disminución del volumen tumoral. Un "efecto anticancerígeno" también puede manifestarse por la capacidad de los SAR de prevenir la aparición del cáncer en primer lugar.

[00131] El término "antígeno" o "Ag" se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células específicas inmunológicamente competentes, o ambas cosas. En la **Tabla B** se describen ejemplos no limitativos de antígeno o antígenos que pueden unirse específicamente a cualquiera de los dominios de unión a antígeno.

[00132] Un "dominio de unión a antígeno" o "módulo de unión a antígeno" o "segmento de unión a antígeno" o "dominio específico de antígeno" (DEA) se refiere a un polipéptido o péptido que, debido a su secuencia primaria, secundaria o terciaria, modificaciones postraduccionales y/o carga se une a un antígeno con un alto grado de especificidad. En realizaciones a modo de ejemplo, los antígenos diana y los SEQ ID NO de diversos dominios de unión a antígeno se exponen en las **Tablas 3-7** del presente documento. En realizaciones de ejemplo, el antígeno diana y los SEQ ID NO de vL, vH, scFVs, y sus regiones CDR se establecen en el presente documento en las **Tablas 6A-C** de la solicitud de patente PCT/US18/53247 y en las **Tablas 3-4** de la solicitud de patente PCT/US19/035096, que se incorporan en su totalidad por referencia en el presente documento.

[00133] El término "autoantígeno" se refiere a un antígeno endógeno que estimula la producción de una respuesta autoinmune, como la producción de autoanticuerpos. Algunos ejemplos de autoantígenos son, entre otros, la desmogleína 1, la desmogleína 3 y sus fragmentos.

[00134] "Avidez" se refiere a la fuerza de la interacción entre un agente y su objetivo.

[00135] Como se utiliza en el presente documento, el término "columna vertebral" o "arquitectura" se refiere a la configuración de los diferentes componentes (*p.ej.*, dominios de unión a antígeno, dominios bisagra, dominios transmembrana, dominios de señalización) que comprenden diferentes SAR y cualquier módulo accesorio que generalmente es opcional.

[00136] **Tabla 1:** Arquitecturas de CAR convencionales. Los CAR convencionales de primera generación (CAR 1 convencionales) tienen un dominio de señalización intracelular (DSI) (*p.ej.*, CD3z) y ningún dominio coestimulador. Las proteínas de fusión de TCR (TFP) son otro ejemplo de CAR 1 convencionales. Los CAR convencionales de segunda generación (CAR 2 convencionales o CAR II) tienen un dominio coestimulador (*p.ej.*, 41BB o CD28) y un dominio de señalización intracelular (ISD) (*p.ej.*, CD3z). Los CAR convencionales de tercera generación (CAR 3 convencionales o CAR III) tienen dos dominios coestimuladores (*p.ej.*, 41BB y CD28) y un dominio de señalización intracelular (ISD) (*p.ej.*, CD3z). Los Ab-TCR son receptores de doble cadena que incorporan un dominio vL-enlazador-TCR (TCRD) y un dominio vH-enlazador-TCR (TCRD) y se han descrito en el documento PCT/US2016/058305. Los cTCR (receptores quiméricos de células T) son receptores de cadena única, cadena y media

o cadena doble que constan de un dominio de unión a antígeno derivado de un fragmento vL y vH que se fusionan a una o más cadenas constantes TCR (TCR-C) y dan lugar a la activación de la señalización de células T. Las cadenas constantes TCR de los cTCR están codificadas por secuencias de ácido nucleico de tipo salvaje y las correspondientes secuencias de aminoácidos de tipo salvaje. En PCT/US2017/064379 o WO 2018/102795 A1 se describen diferentes configuraciones de cTCR. Los receptores inmunes sintéticos son CAR de próxima generación y se describen en PCT/US2017/064379 o WO 2018/102795 A1. Los SIR son receptores de cadena simple, cadena y media o cadena doble. En una realización, el dominio de unión a antígeno de SIR se deriva de un fragmento vL y vH que se fusionan a una o más cadenas constantes de TCR (TCR-C) y dan lugar a la activación de la señalización de células T. En algunas realizaciones, las cadenas constantes TCR de SIR están codificadas por secuencias de ácido nucleico humanas optimizadas para codón y comprenden una o más mutaciones que mejoran su expresión y acoplamiento de cadena. Los zSIR son receptores de doble cadena que comprenden dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, vL, vH, etc.) que están unidos operativamente a dos cadenas CD3z o fragmentos de las mismas con enlazadores opcionales y se describen en PCT/US2019/035096.

TABLA 1 EJEMPLO DE ARQUITECTURAS CAR CONVENCIONALES							
1	CAR 1 o CAR I (incluido TFP)	TEA	HR	TMD	ISD		
2	CAR 2 (CAR II)	TEA	HR	TMD	CSD	ISD	
3	CAR 3 (CAR III)	TEA	HR	TMD	CDS-I	CDS-II	ISD
4	Ab-TCR	vL-cL	TCRD(1)	2A	vH-CH1	TCRD (II)	
5	cTCR/SIR-1 de Doble Cadena	vL	TCR-C(1)	2A	vH	TCR-C (II)	
6	zSIR de Doble Cadena	Enlazad or vL	CD3z	2A	Enlazado r vH	CD3z	
7	cTCR/SIR-3 de cadena y media		TCR-C(1)	2A	TEA	TCR-C (II)	

[00137] Las **Tablas 2A-2J** proporcionan ejemplos de arquitecturas de SAR uniespecíficos, biespecíficos y multiespecíficos de la presente divulgación. Las abreviaturas utilizadas son: SP (péptido señal); AADB (dominio autónomo de unión a antígeno); L (enlazador opcional); LL (enlazador largo), (AABD-L)_n (n copias de AABD con enlazador opcional donde n = 0, 1, 2, 3, 4 o más), AABD1-4 (diferentes AABD dirigidos a uno o más antígenos), V1 (cadenas vL, vH, Va, Vb, Vg o Vd), Ig (enlazador Ig), TCR-Ig (dominio enlazador Ig derivado de cadenas TCR), ConP (péptido conector), TM (dominio transmembrana), CP (dominio citosólico), IC (dominio intracelular), Ca (cadena constante TCR α), Cb (cadena constante TCR β), Cg (cadena constante TCR γ), Cd (cadena constante TCR δ), scFv (fragmento variable de cadena única), scTFv (fragmento de cadena única que comprende dos fragmentos variables de un TCR, por *ej.*, Va y Vb), dCa/dCb/dCg/dCd (cadena

constante N-terminalmente suprimida de TCR α , β , γ o δ que carece de su dominio enlazador Ig), TCR-ConnP (péptido conector de la cadena constante de TCR α , β , γ o δ), Ca-ConnP (péptido conector de la cadena constante de TCR α), IgCL (enlazador Ig de la cadena ligera de inmunoglobulina), IgCH1 (Enlazador Ig de la cadena pesada de la inmunoglobulina), CD3 $\epsilon\gamma\delta$ ECD (dominio extracelular de las cadenas CD3 ϵ , γ o δ), CSD (dominio coestimulador), 4-1BB o BB (dominio coestimulador de 4-1BB), CD28 o 28 (dominio coestimulador de CD28), CD3z o zd o z (dominio de activación de CD3z). Nkp30-Ig (dominio de tipo inmunoglobulina de Nkp30), Nkp44-Ig (dominio de tipo inmunoglobulina de Nkp44), Nkp46-Ig1-Ig2 (dominios de tipo inmunoglobulina 1 y 2 de Nkp46), CD16-D1 (dominio 1 de CD16), CD16-D2 (dominio 2 de CD16), scTCR (TCR de cadena única), dominio extracelular (ECD), dominio de activación (AD). Va, Vb, Vg, Vd (dominios variables de TCR α , β , γ y δ), FCRG (FcR γ); dominio bisagra (Hn).

TABLA 2A EJEMPLO TCR-SAR CON RESPALDO DE zSAR

1	SP	L	(AABD-L)n	Va	L	Ig	ECD	TM	CP	
	SP	L	(AABD-L)n	Vb	L	Ig	ECD	TM	CP	
2	SP	L	(AABD-L)n	Va	L	Ig	Bisagra	TM	CP	
	SP	L	(AABD-L)n	Vb	L	Ig	Bisagra	TM		
3	SP	L	(AABD-L)n	Va	L	Ig	CD3z-ECD	CD3z-TM	CD3z-CP	
	SP	L	(AABD-L)n	Vb	L	Ig	CD16-ECD	CD16-TM		
4	SP	L	(AABD-L)n	Va	L	TCR-Ig	CD3z-ECD	CD3z-TM	CD3z-CP	
	SP	L	(AABD-L)n	Vb	L	TCR-Ig	CD16-HN	CD16-TM	41BB o CD28	
5	SP	L	(AABD-L)n	Va	L	TCRa-Ig	CD3z-ECD	CD3z-TM	CD3z-CP	
	SP	L	(AABD-L)n	Vb	L	TCRb-Ig	CD16-HN	CD16-TM	CD8a o CD8b o CD4	
6	SP	L	(AABD-L)n	Va	L	TCRa-Ig	CD3z-ECD	CD3z-TM	41BB-CD3zCP	
	SP	L	(AABD-L)n	Vb	L	TCRb-Ig	CD16-HN	CD16-TM	Lck o LAT o SLP-76	
7	SP	L	(AABD-L)n	Va	L	TCRa-Ig	CD3z-ECD	CD3z-TM	41BB-CD3zCP	
	SP	L	(AABD-L)n	Vb	L	TCRb-Ig	CD3z-ECD	CD3z-TM	Lck o LAT o SLP-76	
7	SP	L	(AABD-L)n	Va	L	Enlazad or Ig	FcRy-ECD	FcRy-TM	41BB-FcRyCP	
	SP	L	(AABD-L)n	Vb	L	Enlazad or Ig	CD3z-ECD	CD3z-TM	Lck o LAT o SLP-76	
7	SP	L	(AABD-L)n	Va	L	Enlazad or Ig	FcRy-ECD	FcRy-TM	41BB-FcRyCP	
	SP	L	(AABD-L)n	Vb	L	Enlazad or Ig	CD16-HN	CD16-TM	Lck o LAT o SLP-76	

Los Va y Vb de las construcciones de la Tabla 2A pueden sustituirse por fragmentos vL y vH derivados de anticuerpos. Puede cambiarse el orden de Va, Vb, vL y vH. Del mismo modo, uno o más fragmentos CD3z pueden sustituirse por fragmentos FcRy correspondientes. Los dominios enlazadores Ig pueden derivarse de inmunoglobulinas o

cadenas constantes TCR. Uno o ambos dominios citosólicos CD3z pueden tener la mutación dQ101.

CUADRO 2C EJEMPLO SAR

SP	L	(AABD-L) _n	(scFv-L) _n	L	CD16-D1	CD16-D2	CD16-Hn	CD16-TM	4-1BB	
SP	L	(AABD-L) _n	(scFv-L) _n	L	CD16-D1	CD16-D2	CD16-HN	CD16-TM		

TABLA 2D EJEMPLO TCR-SAR CON RED TRONCAL DE zSAR

1	SP	L	(AABD-L) _n	vL	L	Enlazador IG	CD3z-ECD	CD3z-TM	CD3z-CP	
	SP	L	(AABD-L) _n	vH	L	Enlazador IG	CD16-HN	CD16-TM		
2	SP	L	(AABD-L) _n	vL	L	IgCL	CD3z-ECD	CD3z-TM	CD3z-CP	
	SP	L	(AABD-L) _n	vH	L	IgG1-CH1	CD16-HN	CD16-TM	Dominio citosólico 4-1BB o CD28 o CD8a, o CD8b o CD4	
3	SP	L	(AABD-L) _n	vL	L	IgCL	CD3z-ECD	CD3z-TM	4-1BB	CD3z-CP
	SP	L	(AABD-L) _n	vH	L	IgG1-CH1	CD16-HN	CD16-TM	4-1BB	CD3z-CP

Los vL y vH de las construcciones de la Tabla 2D pueden sustituirse por fragmentos Va, Vb, Vg o Vd. El orden de Va, Vb, Vg, Vd, vL y vH puede cambiarse para que se unan a cadenas diferentes. Del mismo modo, uno o más fragmentos CD3z pueden sustituirse por fragmentos FcRy correspondientes. Los dominios enlazadores Ig pueden derivarse de inmunoglobulinas o cadenas constantes TCR. Uno o ambos dominios citosólicos CD3z pueden tener la mutación dQ101.

TABLA 2E EJEMPLO zSAR y zCD16-SAR

1	SP	L	(AABD-L) _n	vL	L	Ig (Enlazador Ig)	ECD	TM	CSD	CP (AD)
	SP	L	(AABD-L) _n	vH	L	Ig (Enlazador Ig)	ECD	TM	CSD	CP (AD)
2	SP	L	(AABD-L) _n	vL	L	Ig (Enlazador Ig)	Bisagra	TM	CSD	CP (AD)
	SP	L	(AABD-L) _n	vH	L	Ig (Enlazador Ig)	Bisagra	TM	CSD	CP (AD)
3	SP	L	(AABD-L) _n	vL	L	Ig (Enlazador Ig)	CD3z-ECD	CD3z-TM	41BB	CD3z-CP

	SP	L	(AABD-L) _n	vH	L	Ig (Enlazador or Ig)	CD16-HN	CD16-TM	41B B	CD16-CP
4	SP	L	(AABD-L) _n	vL	L	IgCL	CD3z-ECD	CD3z-TM	41B B	CD3z-CP
	SP	L	(AABD-L) _n	vH	L	IgG1-CH1	CD3z-ECD	CD3z-TM	CD2 8	CD3z-CP
5	SP	L	(AABD-L) _n	vL	L	IgCL	CD3z-ECD	CD3z-TM		CD3z-CP
	SP	L	(AABD-L) _n	vH	L	IgG1-CH1	CD3z-ECD	CD3z-TM		Lck, LAT o SLP-76
6	SP	L	(AABD-L) _n	vL	L	IgCL	CD3z-ECD	CD3z-TM		LAT
	SP	L	(AABD-L) _n	vH	L	IgG1-CH1	CD3z-ECD	CD3z-TM		SLP-76

Los vL y vH de las construcciones de la Tabla 2E pueden sustituirse por fragmentos Va, Vb, Vg o Vd. El orden de Va, Vb, Vg, Vd, vL y vH puede cambiarse para que se unan a cadenas diferentes. Del mismo modo, uno o más fragmentos CD3z pueden sustituirse por fragmentos FcRγ correspondientes. Los dominios enlazadores Ig pueden derivarse de inmunoglobulinas o cadenas constantes TCR. Uno o ambos dominios citosólicos CD3z pueden tener la mutación dQ101.

TABLA 2F. EJEMPLO SAR (SIR) con CADENAS TCR HÍBRIDAS

					ENLAZADOR TIPO IG (Dominio Constante)	PÉPTIDO CONECTOR	TM	CP (IC)
1	SP	L	vL	L	Alfa	Alfa	Alfa	Alfa
	SP	L	vH	L	Beta	Beta	Beta	Beta
2	SP	L	vL	L	Alfa	Beta	Beta	Beta
	SP	L	vH	L	Beta	Alfa	Alfa	Alfa
3	SP	L	vL	L	Alfa	Alfa	Beta	Beta
	SP	L	vH	L	Beta	Beta	Alfa	Alfa
4	SP	L	vL	L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
5	SP	L	vL	L	Gamma	Gamma	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Delta	Gamma	Gamma
6	SP	L	vL	L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
7	SP	L	vL	L	Alfa	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Gamma	Alfa	Alfa	Alfa
8	SP	L	vL	L	Alfa	Alfa	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Gamma	Gamma	Alfa	Alfa
9	SP	L	vL	L	Alfa	Delta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Alfa	Alfa	Alfa

10	SP	L	vL	L	Beta	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Gamma	Beta	Beta	Beta
11	SP	L	vL	L	Beta	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Gamma	Gamma	Beta	Beta
12	SP	L	vL	L	Beta	Delta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Beta	Beta	Beta
13	SP	L	vL	L	Beta	Beta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Delta	Beta	Beta
14	SP	L	vL	L	Beta	Beta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Delta	Beta	Beta
15	SP	L	vL	L	Alfa	Gamma	Gamma	Alfa
	SP	L	vH	L	Beta	Delta	Delta	Beta
16	SP	L	vL	L	Alfa	Gamma	Gamma	Alfa
	SP	L	vH	L	Beta	Delta	Delta	Beta
17	SP	L	vL	L	Alfa	Delta	Delta	Alfa
	SP	L	vH	L	Beta	Gamma	Gamma	Beta
18	SP	L	vL	L	Gamma	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L	vH	L	Delta	Beta	Beta	Delta
19	SP	L	vL	L	Gamma	Beta	Beta	Gamma
	SP	L	vH	L	Delta	Alfa	Alfa	Delta
20	SP	L	vL	L	Alfa	Alfa	Alfa	Beta
	SP	L	vH	L	Beta	Beta	Beta	Alfa
21	SP	L	vL	L	Gamma	Gamma	Gamma	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Delta	Delta	Gamma
22	SP	L	vL	L	Alfa	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L	vH	L	Gamma	Gamma	Gamma	Alfa
23	SP	L	vL	L	Alfa	Alfa	Alfa	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Delta	Delta	Alfa
24	SP	L	vL	L	Beta	Beta	Beta	Gamma
	SP	L	vH	L	Gamma	Gamma	Gamma	Beta
25	SP	L	vL	L	Beta	Beta	Beta	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Delta	Delta	Beta
26	SP	L	vL	L	Alfa	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L	vH	L	Beta	Beta	Beta	Delta
27	SP	L	vL	L	Gamma	Gamma	Gamma	Alfa
	SP	L	vH	L	Delta	Delta	Delta	Beta
28	SP	L	vL	L	Beta	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Delta	Delta	Delta	Delta
29	SP	L	vL	L	Beta	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Alfa	Alfa	Alfa	Alfa
30	SP	L	vL	L	Beta	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Alfa	Alfa	Delta	Delta
31	SP	L	vL	L	Beta	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Alfa	Delta	Delta	Delta
32	SP	L	vL	L	Gamma	Gamma	Beta	Beta
	SP	L	vH	L	Delta	Delta	Alfa	Alfa
33	SP	L	vL	L	Enlazador Ig	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Enlazador Ig	Delta	Delta	Delta
34	SP	L	vL	L	Enlazador Ig	Beta	Gamma	Gamma

	SP	L	vH	L	Enlazador Ig	Delta	Delta	Delta
35	SP	L	vL	L	Enlazador Ig	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Enlazador Ig	Alfa	Alfa	Alfa
36	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH1	Delta	Delta	Delta
37	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH1	Alfa	Alfa	Alfa
38	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Delta	Delta	Delta
39	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Alfa	Alfa	Alfa
40	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Alfa	Delta	Delta
41	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH1	Delta	Delta	Delta
42	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Beta	Beta
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Delta	Alfa	Alfa
43	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Delta	Alfa	Alfa
44	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	vL	L	IgCL	Delta	Alfa	Alfa
45	SP	L	vL	L	Beta	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vH	L	Alfa	Alfa	Alfa	Alfa

TABLA 2G. EJEMPLO SAR (SIR) con CADENAS TCR HÍBRIDAS

					ENLAZADOR TIPO IG (Dominio Constante)	PÉPTIDO CONECTOR (ConnP)	TM	CP (IC)
1	SP	L	vL	L	Enlazador Ig	Alfa	Alfa	Alfa
	SP	L	vH	L	Enlazador Ig	Beta	Gamma	Gamma
2	SP	L	vL	L	Enlazador Ig	Beta	Beta	Beta
	SP	L	vH	L	Enlazador Ig	Alfa	Delta	Delta
3	SP	L	vL	L	IgCL	Alfa	Beta	Beta
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Beta	Alfa	Alfa
4	SP	L	vL	L	IgCL	Delta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Beta	Gamma	Gamma
5	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Delta	Delta

	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Delta	Gamm a	Gamma
6	SP	L	vL	L	IgCL	Delta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	Delta	Gamma	Gamm a	Gamma
7	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	Gamma	Alfa	Alfa	Alfa
8	SP	L	vL	L	IgCL	Alfa	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	Gamma	Gamma	Alfa	Alfa
9	SP	L	vL	L	IgCL	Delta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	delta	Alfa	Alfa	Alfa
10	SP	L	vL	L	IgG-CH1	Gamma	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	Gamma	Beta	Beta	Beta
11	SP	L	vL	L	Beta	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH1	Gamma	Beta	Beta
12	SP	L	vL	L	IgCL	Delta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Beta	Beta	Beta
13	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	IgG4-CH1	Delta	Beta	Beta
14	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Delta	Beta	Beta
15	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Gamm a	Alfa
	SP	L	vH	L	IgG1-CH1	Delta	Delta	Beta
16	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Gamm a	Alfa
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Delta	Delta	Beta
17	SP	L	vL	L	IgCL	Delta	Delta	Alfa
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Gamma	Gamm a	Beta
18	SP	L	vL	L	IgCL	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Beta	Beta	Delta
19	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Beta	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG4-CH1	Alfa	Alfa	Delta
20	SP	L	vL	L	IgCL	Alfa	Alfa	Beta
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Beta	Beta	Alfa
21	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Gamm a	Delta
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Delta	Delta	Gamma
22	SP	L	vL	L	IgCL	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Gamma	Gamm a	Alfa

23	SP	L	vL	L	IgCL	Alfa	Alfa	Delta
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Delta	Delta	Alfa
24	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Beta	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Gamma	Gamm a	Beta
25	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Beta	Delta
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Delta	Delta	Beta
26	SP	L	vL	L	IgCL	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Beta	Beta	Delta
27	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Gamm a	Alfa
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Delta	Delta	Beta
28	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Delta	Delta	Delta
29	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Alfa	Alfa	Alfa
30	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Alfa	Delta	Delta
31	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Delta	Delta	Delta
32	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Beta	Beta
	SP	L	vH	L	IgG-CH1	Delta	Alfa	Alfa
33	SP	L	vL	L	Enlazador Ig	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	Enlazador Ig	Delta	Delta	Delta
34	SP	L	vL	L	Enlazador Ig	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	Enlazador Ig	Delta	Delta	Delta
35	SP	L	vL	L	Enlazador Ig	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	Enlazador Ig	Alfa	Alfa	Alfa
36	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH1	Delta	Delta	Delta
37	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH1	Alfa	Alfa	Alfa
38	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Delta	Delta	Delta

39	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Alfa	Alfa	Alfa
40	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Alfa	Delta	Delta
41	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH1	Delta	Delta	Delta
42	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Beta	Beta
	SP	L	vH	L	IgG1-CH1	Delta	Alfa	Alfa
43	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG4-CH1	Delta	Alfa	Alfa
44	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	vL	L	IgCL	Delta	Alfa	Alfa
45	SP	L	vL	L	IgG4-CH	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgCL	Alfa	Alfa	Alfa
46	SP	L	vL	L	IgCL	Gamma	Beta	Beta
	SP	L	vH	L	IgG4-CH	Alfa	Alfa	Alfa
47	SP	L	vL	L	IgCL	Beta	Gamm a	Gamma
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Delta	Delta	Delta
48	SP	L	vL	L	IgCL	Alfa	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	IgG4-CH	Beta	Beta	Beta
49	SP	L	vL	L	IgCL	Alfa	Delta	Delta
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Gamma	Gamm a	Gamma
50	SP	L	vL	L	IgCL	Delta	Alfa	Alfa
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Beta	Beta	Beta
51	SP	L	vL	L	IgCL	Delta	Alfa	Alfa
	SP	L	vH	L	IgG1-CH	Gamma	Gamm a	Gamma

Los fragmentos vL y vH pueden sustituirse por fragmentos $V\alpha$, $V\beta$ o $V\gamma$ y $V\delta$. Uno o ambos enlazadores Ig (IgCL e IgG1-CH1) pueden sustituirse por dominios constantes TCR.

TABLA 2H. EJEMPLO SAR (SIR) con CADENAS TCR HÍBRIDAS

					ENLAZA DOR TIPO IG (Dominio Constante)	PÉPTIDO CONECTOR (ConnP)	TM	CP (IC)
	SP	L	scFv	L	Cadena constante TCR híbrida			

	SP	L		L	Cadena constante TCR híbrida			
1	SP	L	scFv	L	Alfa	Alfa	Alfa	Alfa
	SP	L		L	Beta	Beta	Beta	Beta
2	SP	L	scFv	L	Alfa	Beta	Beta	Beta
	SP	L		L	Beta	Alfa	Alfa	Alfa
3	SP	L		L	Alfa	Alfa	Beta	Beta
	SP	L	scFv	L	Beta	Beta	Alfa	Alfa
4	SP	L	scFv	L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L		L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
5	SP	L	scFv	L	Gamma	Gamma	Delta	Delta
	SP	L		L	Delta	Delta	Gamma	Gamma
6	SP	L	scFv	L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L		L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
7	SP	L	scFv	L	Alfa	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L		L	Gamma	Alfa	Alfa	Alfa
8	SP	L		L	Alfa	Alfa	Gamma	Gamma
	SP	L	scFv	L	Gamma	Gamma	Alfa	Alfa
9	SP	L	scFv	L	Alfa	Delta	Delta	Delta
	SP	L		L	Delta	Alfa	Alfa	Alfa
10	SP	L	scFv	L	Beta	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L		L	Gamma	Beta	Beta	Beta
11	SP	L	scFv	L	Beta	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L		L	Gamma	Gamma	Beta	Beta
12	SP	L	scFv	L	Beta	Delta	Delta	Delta
	SP	L		L	Delta	Beta	Beta	Beta
13	SP	L	scFv	L	Beta	Beta	Delta	Delta
	SP	L		L	Delta	Delta	Beta	Beta
14	SP	L	scFv	L	Beta	Beta	Delta	Delta
	SP	L		L	Delta	Delta	Beta	Beta
15	SP	L	scFv	L	Alfa	Gamma	Gamma	Alfa
	SP	L		L	Beta	Delta	Delta	Beta
16	SP	L	scFv	L	Alfa	Gamma	Gamma	Alfa
	SP	L		L	Beta	Delta	Delta	Beta
17	SP	L	scFv	L	Alfa	Delta	Delta	Alfa
	SP	L		L	Beta	Gamma	Gamma	Beta
18	SP	L		L	Gamma	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L	scFv	L	Delta	Beta	Beta	Delta
19	SP	L	scFv	L	Gamma	Beta	Beta	Gamma
	SP	L		L	Delta	Alfa	Alfa	Delta
20	SP	L	scFv	L	Alfa	Alfa	Alfa	Beta
	SP	L		L	Beta	Beta	Beta	Alfa
21	SP	L	scFv	L	Gamma	Gamma	Gamma	Delta
	SP	L		L	Delta	Delta	Delta	Gamma
23	SP	L	scFv	L	Alfa	Alfa	Alfa	Delta
	SP	L		L	Delta	Delta	Delta	Alfa
24	SP	L		L	Beta	Beta	Beta	Gamma
	SP	L	scFv	L	Gamma	Gamma	Gamma	Beta
25	SP	L	scFv	L	Beta	Beta	Beta	Delta

	SP	L		L	Delta	Delta	Delta	Beta
26	SP	L	scFv	L	Alfa	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L		L	Beta	Beta	Beta	Delta
27	SP	L	scFv	L	Gamma	Gamma	Gamma	Alfa
	SP	L		L	Delta	Delta	Delta	Beta
28	SP	L	scFv	L	Gamma	Gamma	Gamma	Alfa
	SP	L	scFv	L	Delta	Delta	Delta	Beta
29	SP	L		L	Alfa	Beta	Beta	Beta
	SP	L	vHH	L	Beta	Alfa	Alfa	Alfa
30	SP	L	FHVH	L	Alfa	Alfa	Beta	Beta
	SP	L		L	Beta	Beta	Alfa	Alfa
31	SP	L	vHH1	L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L	vHH2	L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
32	SP	L	scFv	L	Gamma	Gamma	Delta	Delta
	SP	L	FHVH	L	Delta	Delta	Gamma	Gamma
33	SP	L	FHVH	L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L	DAR	L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
34	SP	L	CENT	L	Alfa	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	vHH	L	Gamma	Alfa	Alfa	Alfa
35	SP	L	vHH	L	Alfa	Alfa	Gamma	Gamma
	SP	L	scFv	L	Gamma	Gamma	Alfa	Alfa
45	SP	L	scFv	L	IgCL	Alfa	Beta	Beta
	SP	L	scFv	L	IgG1-CH1	Beta	Alfa	Alfa
46	SP	L	scFv	L	IgCL	Delta	Delta	Delta
	SP	L	scFv	L	IgG4-CHI1	Gamma	Gamma	Gamma
47	SP	L	DARP	L	IgCL	Gamma	Delta	Delta
	SP	L	scFv	L	IgG1-CHI1	Delta	Gamma	Gamma
48	SP	L	CENT	L	IgCL	Delta	Delta	Delta
	SP	L	scFv	L	IgG1-CHI1	Gamma	Gamma	Gamma
49	SP	L	CENT	L	IgCL	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	scFv	L	IgG1-CH	Delta	Alfa	Alfa
50	SP	L	DARP	L	IgG1-CH	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	CENT	L	IgCL	Delta	Alfa	Alfa
51	SP	L	vHH1	L	beta	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	vHH2	L	alfa	Alfa	Alfa	Alfa
52	SP	L	AABD	L	IgCL	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	AABD	L	IgG1-CH	Delta	Alfa	Alfa
53	SP	L	AABD	L	IgG1-CH	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	AABD	L	IgCL	Delta	Alfa	Alfa
54	SP	L	AABD	L	Beta	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	AABD	L	Alfa	Alfa	Alfa	Alfa

TABLA 2I. EJEMPLO SAR con CADENAS TCR HÍBRIDAS

				DOMINIO O VARIABLE		ENLAZADO OR TIPO IG (Dominio Constante)	PÉPTIDO CONECTOR (ConnP)	TM	CP (IC)
1	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Alfa	Alfa	Alfa
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Beta	Beta	Beta	Beta
2	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Beta	Beta	Beta

	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Beta	Alfa	Alfa	Alfa
3	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Alfa	Beta	Beta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Beta	Beta	Alfa	Alfa
4	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
5	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Gamma	Gamma	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Delta	Gamma	Gamma
6	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
7	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Gamma	Alfa	Alfa	Alfa
8	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Alfa	Gamma	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Gamma	Gamma	Alfa	Alfa
9	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Delta	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Alfa	Alfa	Alfa
10	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Beta	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Gamma	Beta	Beta	Beta
11	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Beta	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Gamma	Gamma	Beta	Beta
12	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Beta	Delta	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Beta	Beta	Beta
13	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Beta	Beta	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Delta	Beta	Beta
14	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Beta	Beta	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Delta	Beta	Beta
15	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Gamma	Gamma	Alfa
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Beta	Delta	Delta	Beta
16	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Gamma	Gamma	Alfa
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Beta	Delta	Delta	Beta
17	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Delta	Delta	Alfa
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Beta	Gamma	Gamma	Beta
18	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Gamma	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Beta	Beta	Delta
19	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Gamma	Beta	Beta	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Alfa	Alfa	Delta
20	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Alfa	Alfa	Beta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Beta	Beta	Beta	Alfa
21	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Gamma	Gamma	Gamma	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Delta	Delta	Gamma
22	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Gamma	Gamma	Gamma	Alfa
23	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Alfa	Alfa	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Delta	Delta	Alfa
24	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Beta	Beta	Beta	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Gamma	Gamma	Gamma	Beta
25	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Beta	Beta	Beta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Delta	Delta	Beta
26	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Alfa	Alfa	Alfa	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Beta	Beta	Beta	Delta

27	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Gamma	Gamma	Gamma	Alfa
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Delta	Delta	Delta	Beta
28	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Alfa	Alfa	Alfa	Alfa
	SP	L			L	Beta	Beta	Beta	Beta
29	SP	L			L	Alfa	Beta	Beta	Beta
	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Beta	Alfa	Alfa	Alfa
30	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Alfa	Alfa	Beta	Beta
	SP	L			L	Beta	Beta	Alfa	Alfa
31	SP	L			L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
32	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Gamma	Gamma	Delta	Delta
	SP	L			L	Delta	Delta	Gamma	Gamma
33	SP	L			L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
34	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Alfa	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L			L	Gamma	Alfa	Alfa	Alfa
35	SP	L			L	Alfa	Alfa	Gamma	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Gamma	Gamma	Alfa	Alfa
36	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Alfa	Delta	Delta	Delta
	SP	L			L	Delta	Alfa	Alfa	Alfa
37	SP	L			L	Beta	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Gamma	Beta	Beta	Beta
38	SP	L	(AABD-L)n	vHH	L	Alfa	Alfa	Alfa	Alfa
	SP	L			L	Beta	Beta	Beta	Beta
39	SP	L			L	Alfa	Beta	Beta	Beta
	SP	L	(AABD-L)n	vHH	L	Beta	Alfa	Alfa	Alfa
43	SP	L	(AABD-L)n	vHH	L	Gamma	Delta	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vHH	L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
44	SP	L	(AABD-L)n	FHV H	L	Alfa	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vHH	L	Gamma	Alfa	Alfa	Alfa
45	SP	L	(AABD-L)n	vHH	L	Alfa	Alfa	Gamma	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Gamma	Gamma	Alfa	Alfa
46	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Alfa	Delta	Delta	Delta
	SP	L	(AABD-L)n	vHH	L	Delta	Alfa	Alfa	Alfa
47	SP	L	(AABD-L)n	FHV H	L	Beta	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	scFv	L	Gamma	Beta	Beta	Beta
48	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	IgCL	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	IgG1-CH	Delta	Alfa	Alfa
49	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	IgG1-CH	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	IgCL	Delta	Alfa	Alfa
50	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Beta	Beta	Gamma	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Alfa	Alfa	Alfa	Alfa
51	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	IgCL	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	IgG1-CH	Delta	Alfa	Alfa
52	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	IgG1-CH	Gamma	Beta	Gamma
	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	IgCL	Delta	Alfa	Alfa
53	SP	L	(AABD-L)n	vL	L	Beta	Beta	Gamma	Gamma

	SP	L	(AABD-L)n	vH	L	Alfa	Alfa	Alfa	Alfa
--	----	---	-----------	----	---	------	------	------	------

TABLA 2J. EJEMPLO DE TCR CON CADENAS HÍBRIDAS QUE COMPRENDEN DOMINIOS CONSTANTES DE ANTICUERPOS

					ENLAZADOR TIPO IG (Dominio Constante)	PÉPTIDO DE CONEXIÓN (ConnP)	TM	CP (IC)
1	SP	L	Va	L	Enlazador Ig	Alfa	Alfa	Alfa
	SP	L	Vb	L	Enlazador Ig	Beta	Beta	Beta
2	SP	L	Vg	L	Enlazador Ig	Alfa	Alfa	Alfa
	SP	L	Vd	L	Enlazador Ig	Beta	Beta	Beta
3	SP	L	Va	L	IgCL	Alfa	Beta	Beta
	SP	L	Vb	L	IgG-CH1	Beta	Alfa	Alfa
4	SP	L	Va	L	IgCL	Delta	Delta	Delta
	SP	L	Vb	L	IgG-CH1	Beta	Gamma	Gamma
5	SP	L	Va	L	IgCL	Gamma	Delta	Delta
	SP	L	Vb	L	IgG-CH1	Delta	Gamma	Gamma
6	SP	L	Va	L	IgCL	Delta	Delta	Delta
	SP	L	Vb	L	Delta	Gamma	Gamma	Gamma
7	SP	L	Va	L	IgCL	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	Vb	L	Gamma	Alfa	Alfa	Alfa
8	SP	L	Va	L	IgCL	Alfa	Gamma	Gamma
	SP	L	Vb	L	Gamma	Gamma	Alfa	Alfa
9	SP	L	Va	L	IgCL	Delta	Delta	Delta
	SP	L	Vb	L	Delta	Alfa	Alfa	Alfa
10	SP	L	Va	L	IgG-CH1	Gamma	Gamma	Gamma
	SP	L	Vb	L	Gamma	Beta	Beta	Beta

[00138] "Se une al mismo epítipo que" significa la capacidad de un anticuerpo, scFv u otro dominio de unión a antígeno de unirse a un antígeno diana y tener el mismo epítipo que un anticuerpo, scFv u otro dominio de unión a antígeno ejemplificado.

[00139] Debe inferirse sin recitación explícita y a menos que se pretenda lo contrario, que cuando la divulgación se refiere a un polipéptido, proteína, polinucleótido, anticuerpo, SAR o fragmento del mismo, se entiende dentro del alcance de esta divulgación un equivalente o un equivalente biológico del mismo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "equivalente biológico del mismo" o "variante" o "variante funcional" pretende ser sinónimo de "equivalente del mismo" cuando se refiere a una proteína de referencia o un fragmento de la misma, un anticuerpo o un fragmento del mismo, un receptor o un fragmento del mismo, un ligando o un fragmento del mismo, un dominio de unión a antígeno no inmunoglobulina o un fragmento del mismo, un SAR o un fragmento del mismo, un SIR o un fragmento del mismo, un CAR o un fragmento del mismo. Un polipéptido o ácido nucleico "equivalente biológico del mismo" o "variante" o "variante funcional" se refiere a aquellos que tienen una homología

mínima, pero mantienen la estructura o funcionalidad deseadas. A menos que se mencione específicamente en el presente documento, se contempla que cualquiera de los anteriores también incluye equivalentes de los mismos, incluidas isoformas empalmadas alternativamente y equivalentes de otras especies animales. Por ejemplo, una variante pretende al menos aproximadamente un 70% de homología o identidad, o al menos un 80% de homología o identidad y alternativamente, o al menos aproximadamente un 85%, o alternativamente al menos aproximadamente un 90%, o alternativamente al menos aproximadamente un 95%, o alternativamente al menos un 98% de homología o identidad y exhibe una actividad biológica sustancialmente equivalente a la proteína, polipéptido, anticuerpo, o fragmento del mismo, o ácido nucleico de referencia. Alternativamente, cuando se hace referencia a polinucleótidos, una variante de los mismos es un polinucleótido que hibrida en condiciones estrictas con el polinucleótido de referencia o su complemento. Alternativamente, cuando se hace referencia a polipéptidos o proteínas, una variante de los mismos es un polipéptido o proteína expresado a partir de un polinucleótido que hibrida en condiciones estrictas con el polinucleótido o su complemento que codifica el polipéptido o proteína de referencia.

[00140] Se reconocerá que las proteínas pueden tener identidad u homología entre sí y conservar funciones similares o idénticas. En una realización, una "variante" o "variante funcional" de polipéptido, tal como se utiliza en el presente documento, es un polipéptido que difiere del polipéptido mencionado en sustituciones y/o modificaciones conservadoras, de tal manera que se conservan las propiedades terapéuticas, antigénicas y/o inmunogénicas del polipéptido. Las variantes del polipéptido suelen presentar al menos un 70%, más típicamente al menos un 90% y más típicamente al menos un 95% de homología con los polipéptidos identificados. Para los polipéptidos con propiedades inmunorreactivas, las variantes pueden, alternativamente, identificarse modificando la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos anteriores y evaluando la inmunorreactividad del polipéptido modificado. Tales secuencias modificadas pueden prepararse y ensayarse utilizando, *p.ej.*, los procedimientos representativos descritos en el presente documento. La divulgación incluye variantes funcionales de SAR, componentes de SAR y fragmentos de SAR (*p.ej.*, regiones extracelulares, bisagra, transmembrana y citosólica de CD16, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ y CD3z, etc.) que tienen al menos un 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 98,5%, 99% o 99,9% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento conservando la actividad biológica. La divulgación también incluye dominios de unión a antígeno, dominios extracelulares, dominios bisagra, dominios transmembrana, dominios citosólicos, dominios coestimuladores, módulos accesorios que tienen al menos un 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 98,5%, 99% o 99,9% de identidad con cualquiera de las secuencias descritas en el presente

documento mientras conservan la actividad biológica. Las variantes y variantes funcionales incluyen homólogos de otras especies (*p.ej.*, ratón, perro, gato, mono, etc.) e isoformas empalmadas alternativas.

[00141] Cada una de las realizaciones y aspectos de la invención incluye variantes de secuencia y fragmentos de las proteínas, proteínas de fusión y los polinucleótidos que codifican las proteínas y proteínas de fusión en los que la longitud de cada región peptídica o dominio que comprende una proteína de fusión varía individualmente en el extremo amino, el extremo carboxi, o ambos extremos, en hasta 10 aminoácidos basándose en la secuencia nativa del polipéptido a partir del cual se obtiene la región peptídica o dominio. En ciertos aspectos, las variantes de secuencia y los fragmentos tienen al menos un 70% % (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, etc.) de la actividad de la proteína de fusión específica en la que se basan.

[00142] En un aspecto de esta realización, la variante o fragmento de secuencia es una variante o fragmento de secuencia en la que la longitud de al menos una región o dominio peptídico que comprende la proteína de fusión varía individualmente en el amino-terminal, el carboxi-terminal, o ambos extremos, en hasta 10 aminoácidos basándose en la secuencia nativa del polipéptido a partir del cual se obtiene la región o dominio peptídico.

[00143] Cada una de las realizaciones y aspectos de la invención también incluye variantes de secuencia y fragmentos de la proteína, polipéptido y proteínas de fusión, y polinucleótidos que codifican los mismos, que tienen al menos un 70 % (*p.ej.*, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, etc.) de identidad de secuencia con una proteína, polipéptido o proteína de fusión específicos definidos en el presente documento, en toda la longitud de dicha proteína de fusión específica. En ciertos aspectos, estas variantes de secuencia tendrán al menos un 70% % (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, etc.) de la actividad de la proteína, polipéptido y proteína de fusión específicos en los que se basan.

[00144] En una realización, la invención incluye variantes de secuencia y fragmentos de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (*p.ej.*, Fab, vL, vH, vHH, scFv, FHVH, etc.), TCR y dominios variables de TCR (*p.ej.*, V α , V β , V γ , V δ , etc.), y polinucleótidos que codifican los mismos, que tienen al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, etc.) de identidad de secuencia con un anticuerpo específico, fragmento de anticuerpo, TCR y dominios variables de TCR definidos en el presente documento, en toda su longitud, excluidas las regiones determinantes complementarias (CDR).

[00145] Tal como se utiliza aquí, el término "complejo CD3" se refiere a un conjunto de moléculas de la superficie celular que comprende numerosas proteínas para la señalización transmembrana de la activación del TCR.

[00146] En el presente documento, el término "CDR" o "región determinante de la complementariedad" se refiere a los sitios no contiguos de combinación de antígenos que se encuentran en la región variable de los polipéptidos de cadena ligera y pesada. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat et al., J. Bio. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); Chothia et al., J. Mol. Bio. 196:901-917 (1987); y MacCallum et al., J. Mol. Bio. 25 262:732-745 (1996), donde las definiciones incluyen solapamientos o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de cualquiera de las dos definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o anticuerpos injertados o variantes de los mismos pretende estar dentro del alcance del término tal como se define y utiliza en el presente documento. Tal como se utilizan en el presente documento, las diferentes CDR de un anticuerpo también podrían definirse mediante una combinación de las diferentes definiciones. Por ejemplo, VHCDR1 podría definirse basándose en Kabat y VHCDR2 podría definirse basándose en Chothia. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR definidas por cada una de las referencias citadas anteriormente son los siguientes:

DEFINICIONES CDR

	Kabat	Chothia	MacCallum
VHCDR1	31-35	26-32	30-35
VHCDR2	50-65	53-55	47-58
VHCDR3	95-102	96-10	193-101
VLCDR1	24-34	26-32	30-36
VLCDR2	50-56	50-52	46-55
VLCDR3	89-97	91-96	89-96

(Los números de residuo corresponden a la referencia identificada).

[00147] Los SEQ ID de las CDR de los segmentos vL y vH de ejemplo que pueden constituir dominios de unión a antígeno de SAR, anticuerpos biespecíficos y otros inmunoterapéuticos de la presente divulgación se proporcionan en SEQ ID NO: 13204-14121 y SEQ ID NO: 14122-15039, respectivamente (**Tablas 6A, B**) del documento PCT/US2018/053247, en las **Tablas 5-6** del documento PCT/US2017/064379 y en la **Tabla 39** del documento PCT/US2021/022641, que se incorporan al presente documento por referencia. Los SEQ ID de los segmentos vL y vH de ejemplo que pueden constituir dominios de unión a antígeno de SAR, anticuerpos y otros inmunoterapéuticos también se proporcionan en la **Tabla 3** de la presente divulgación. Las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de los fragmentos vL y scFvs proporcionados en la presente divulgación se proporcionan en SEQ ID NO: 20989-21015, 41591-41861; 21024-21050, 41862-42132; y 21059-21085, 42133-42403, respectivamente. Los

CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de los fragmentos vH y scFvs proporcionados en la presente divulgación (*p.ej.*, **Tabla 3**) se proporcionan en SEQ ID NO: 21094-21120 y 42404-42674; 21129-21155, 42675-42945; y 21164-21190, 42946-43216, respectivamente. Los CDR1-3 de los nuevos ligantes seleccionados se indican en la **Tabla 8**.

[00148] En una realización, la divulgación proporciona un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o un SAR que comprende (1) el dominio variable de cadena pesada (vH) que comprende las secuencias CDR1-3 de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera complementario (vL) que comprende las CDR1-3 de cadena ligera, que se une al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal que comprende los dominios variables (vL y vH) de secuencias representadas en la **Tabla 3** o que se une al mismo epítipo que un scFv cuya secuencia se representa en la **Tabla 3**; o (2) el dominio variable de cadena pesada representado en la **Tabla 3** y el dominio variable de cadena ligera representado en la **Tabla 3** o (3) un scFv descrito en la **Tabla 3**; o (4) un dominio variable de cadena pesada que tenga al menos un 85% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos descrita en la **Tabla 3** y un dominio variable de cadena ligera que tenga al menos un 85% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos descrita en la **Tabla 3**; o (5) un dominio variable de cadena pesada que tenga al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos en las regiones marco con la secuencia de aminoácidos descrita en la **Tabla 3** y un dominio variable de cadena ligera que tenga al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos en las regiones marco con la secuencia de aminoácidos descrita en la **Tabla 3**. En una realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un Fv, un scFv, un Fab. En una realización, el SAR es un CAR o un CAR de próxima generación (*p.ej.*, SIR, Ab-TCR, zSIR, uTCR-SAR, CD16-SAR, zCD16SAR, etc.).

[00149] En una realización, la divulgación proporciona un anticuerpo de dominio único o un fragmento de anticuerpo, o un SAR que comprende (1) un dominio vHH con la secuencia representada en la **Tabla 5**; o (2) un dominio vHH que tiene una secuencia con al menos un 85% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos representada en la **Tabla 5**; o (3) un dominio vHH que tiene una secuencia con al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos en las regiones marco de la secuencia de aminoácidos representada en la **Tabla 5** y que contienen las CDR1-3 de la secuencia representada en la **Tabla 5**. En una realización, el anticuerpo de dominio único o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico. En una realización, el SAR es un CAR o un CAR de próxima generación (*p.ej.*, SIR, Ab-TCR, zSIR, uTCR-SAR, CD16-SAR, zCD16-SAR, etc.).

[00150] "Cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado.

[00151] "Terapia celular" o "Terapia basada en células" o "Terapia celular inmunitaria" o "Terapia celular de efectores inmunitarios" se refiere a una terapia que implica el uso de células para la prevención o el tratamiento de una enfermedad.

[00152] Los "receptores quiméricos de antígenos" (CAR) son receptores artificiales (no naturales) de células inmunitarias (*p.ej.*, células T) cuyo uso se contempla como terapia contra el cáncer, mediante una técnica denominada transferencia celular adoptiva. En varias realizaciones, los CAR son polipéptidos recombinantes que comprenden un dominio específico de antígeno (ASD), una región bisagra (HR), un dominio transmembrana (TMD), un dominio coestimulador opcional (CSD) y un dominio de señalización intracelular (ISD).

[00153] La "optimización de codones" o "control del sesgo de codones de la especie" se refiere al uso preferido de codones de una célula huésped particular. En una realización, la invención describe proteínas, polipéptidos y fragmentos de los mismos que están optimizados para codones humanos.

[00154] "coexpresar" se refiere a la expresión de dos o más polinucleótidos o genes.

[00155] Una "sustitución conservadora" o "modificaciones conservadoras de la secuencia" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión o la función de la proteína codificada.

[00156] Un "dominio de señalización intracelular coestimulador" o "dominio coestimulador" o "CSD", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la porción de un SAR que potencia la proliferación, la supervivencia y/o el desarrollo de las células T. Cada dominio coestimulador comprende el dominio coestimulador de uno o más de, *p.ej.*, miembros de la superfamilia TNFR, CD28, (4-1BB), CD134, BAFF-R, HVEM, CD27, CD2, CD5, Fas, CD30, CD40, o combinaciones de los mismos.

[00157] El término "molécula coestimuladora" o "receptor coestimulador" se refiere a una pareja de unión afín en una célula inmunitaria (que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando así una respuesta coestimuladora por parte de la célula inmunitaria como, *p.ej.*, proliferación, activación o secreción de citoquinas.

[00158] El término "cTCR" o "receptor quimérico de células T" se refiere a una secuencia codificante de ácido nucleico de TCR de tipo salvaje y la correspondiente proteína de TCR de tipo salvaje unida a un dominio de unión a antígeno que no se deriva de un TCR. Los cTCR se han descrito en (Gross, Waks, & Eshhar, 1989) . Los cTCR se utilizan en algunas realizaciones y como controles de referencia.

[00159] El término "citoplasmático" o "citoplasmático" se refiere a un agente, *p.ej.*, una proteína que está situada en el citoplasma de una célula en su forma madura.

[00160] El término "trastornos degenerativos" hace referencia a una enfermedad que es el resultado de un proceso continuo basado en cambios celulares degenerativos, que afecta a tejidos u órganos.

[00161] "Derivado de", tal y como se utiliza este término en el presente documento, indica una relación entre una primera y una segunda molécula. En general, se refiere a la similitud estructural entre la primera molécula y una segunda molécula y no connota ni incluye una limitación de proceso o fuente en una primera molécula derivada de una segunda molécula.

[00162] "Molécula de dimerización", tal como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a una molécula que promueve la asociación de un primer dominio de conmutación con un segundo dominio de conmutación.

[00163] "Enfermedad a la que se dirigen las células modificadas genéticamente" engloba el hecho de que las células modificadas genéticamente de la divulgación se dirijan a cualquier célula implicada de alguna manera en cualquier enfermedad.

[00164] Como se utiliza en el presente documento, un "conjunto diverso de receptores inmunitarios no naturales" o "conjunto diverso de SAR" se refiere a una pluralidad de receptores inmunitarios no naturales o SAR dirigidos a un antígeno. En una realización, el conjunto diverso de SARs tiene el mismo dominio de unión unido a un conjunto diverso de cadenas de señalización o "backbones". En una realización, el conjunto diverso de SARs puede poseer un rango diverso de afinidades de unión a un antígeno diana. En una realización, el conjunto diverso de SARs puede exhibir niveles de expresión variados.

[00165] Tal y como se utiliza aquí, un "epítopo" se define como la porción de un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, o la porción de un antígeno que se une a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los epítopos pueden ser una secuencia o subsecuencia proteica.

[00166] En el presente documento, el término "activador" se refiere a una molécula, *p.ej.*, un polipéptido de fusión, capaz de formar un enlace entre una célula inmunitaria (*p.ej.*, una célula T, una célula NK, una célula NKT, una célula B, un macrófago, un neutrófilo) y una célula tumoral que provoca la activación de la célula inmunitaria.

[00167] El término "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante con secuencias de control de la expresión enlazadas operativamente a una secuencia de nucleótidos que debe expresarse.

[00168] Una "porción funcional" ("porción biológicamente activa") de una proteína se refiere a una porción de una proteína que conserva una o más funciones de la proteína madura o de longitud completa.

[00169] El término "FcR γ " o "FCER1G" o "FCRG" o "FcRy" utilizado en el presente documento se refiere al gen representado por Gen ID: 2207.

[00170] El término "porción funcional" cuando se utiliza en referencia a un SAR se refiere a cualquier parte o fragmento del SAR, cuya parte o fragmento retiene la actividad biológica del SAR del que forma parte (el SAR padre). Las porciones funcionales abarcan, *p.ej.*, aquellas partes de un SAR que retienen la capacidad de reconocer células diana, o detectar, tratar o prevenir una enfermedad, en una medida similar, igual o superior a la del SAR original. En referencia al SAR original, la porción funcional puede comprender, *p.ej.*, alrededor del 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95%, o más, del SAR original.

[00171] El término "enlazador polipeptídico flexible", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un enlazador peptídico que consiste en aminoácidos tales como residuos de glicina y/o serina utilizados solos o en combinación, para enlazar cadenas polipeptídicas entre sí (*p.ej.*, regiones variables de cadena pesada y variable de cadena ligera entre sí). En una realización, el enlazador polipeptídico flexible es un enlazador Gly/Ser.

[00172] "Células modificadas genéticamente", "células redirigidas", "células modificadas genéticamente" o "células modificadas", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a células que expresan un SAR de la divulgación.

[00173] Un "TCR independiente del HLA" o un "TCR independiente del CMH", tal como se define en el presente documento, es un TCR que puede reconocer un antígeno independientemente de la restricción del CMH.

[00174] Un "dominio variable de TCR independiente de HLA", tal como se define en el presente documento, es el dominio variable de un TCR que puede unirse a un antígeno de forma independiente de HLA.

[00175] Como se utiliza aquí, "restringido por HLA" o "restringido por MHC" se refiere al reconocimiento de antígenos que requiere tanto la molécula MHC como su péptido. A diferencia del reconocimiento de antígenos "no restringido por HLA" o "independiente de HLA" o "no restringido por MHC".

[00176] Tal y como se utiliza aquí, el término "gen heterólogo" se refiere a un gen que no se encuentra en su entorno natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducido en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo de un organismo que ha sido alterado de alguna manera (*p.ej.*, mutado, añadido en múltiples copias, unido a secuencias reguladoras no nativas, etc.). Como otro ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen expresado en un linaje celular previo o futuro o en un estado de diferenciación de una célula. Los genes heterólogos se distinguen de los endógenos en que las secuencias de genes heterólogos suelen estar unidas a secuencias de ADN que no se encuentran asociadas de forma

natural a las secuencias de genes en el cromosoma o están asociadas a porciones del cromosoma que no se encuentran en la naturaleza (*p.ej.*, genes expresados en loci en los que el gen no se expresa normalmente).

[00177] El término "heterólogo", cuando se utiliza en el contexto de los dominios proteicos, se refiere a dominios que no se encuentran en su entorno natural. Por ejemplo, un dominio proteico heterólogo no forma parte de un único polipéptido o proteína natural. Dicho de otro modo, dos dominios son heterólogos si proceden de dos polipéptidos o proteínas diferentes que se encuentran en la naturaleza. Por ejemplo, el dominio constante del TCR α y los dominios transmembrana del TCR β son heterólogos entre sí, ya que proceden de dos polipéptidos o proteínas diferentes.

[00178] Los dos dominios se consideran "dominios heterólogos inter-especies" si se derivan de homólogos de la misma proteína, pero se derivan de dos especies diferentes y si hay <80% de identidad de secuencia de aminoácidos entre los dos dominios. Por ejemplo, el dominio constante del TCR α humano y los dominios transmembrana del TCR α de ratón son heterólogos entre sí si el dominio constante del TCR α humano es menos del 80% idéntico al dominio constante del TCR α de ratón a nivel de aminoácidos o si el dominio transmembrana del TCR α humano es menos del 80% idéntico al dominio transmembrana del TCR α de ratón a nivel de aminoácidos. A efectos de la presente divulgación, dos dominios no se consideran dominios heterólogos inter-especies si < 20% de los residuos de aminoácidos de un dominio proteico perteneciente a una especie se sustituyen por los residuos correspondientes encontrados en una especie diferente. Por ejemplo, el dominio transmembrana del TCR α humano y una variante del dominio constante del TCR humano no se consideran heterólogos inter-especies si < 20% de los residuos de aminoácidos del dominio constante del TCR α humano se sustituyen por los residuos correspondientes que se encuentran en el dominio constante del TCR α de ratón.

[00179] "Región bisagra" (HR), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la región hidrofílica que se encuentra entre el dominio de unión a antígeno y el dominio transmembrana de un SAR. En la **Tabla 29** de la solicitud de patente provisional se proporcionan varios ejemplos de regiones bisagra.

[00180] "Cadena de TCR híbrida" o "Cadena híbrida", tal como se utiliza el término en el presente documento, se refiere a una cadena que comprende al menos un dominio seleccionado del grupo de dominio constante de TCR (CD o C), péptido conector de TCR (ConnP), dominio transmembrana de TCR (TM) y dominio intracitoplasmático de TCR (CP o IC) que es heterólogo. En una realización de ejemplo, una cadena TCR híbrida se refiere a una cadena TCR en la que el dominio TM se deriva de una cadena TCR y al menos uno de los dominios

seleccionados de CD, ConnP e IC se deriva de una cadena TCR diferente. Por ejemplo, si TM se deriva de TCR α humano, entonces al menos uno de los dominios seleccionados de CD, ConnP, e IC se deriva de TCR β 1/ β 2, TCR γ , TCR δ o pre-TCR α . Una cadena híbrida también puede comprender dominios derivados de dos especies diferentes. Así, una cadena híbrida puede comprender un dominio constante TCR α humano y un dominio transmembrana TCR α no humano. Una cadena TCR híbrida puede tener 1, 2, 3 o más dominios heterólogos.

[00181] "SIR de cadena híbrida" o (HC-SIR) o un SAR de cadena híbrida (HC-SAR), tal como se utiliza el término en el presente documento, se refiere a un receptor inmunitario sintético (SIR) heterodimérico o a un receptor de antígeno sintético (SAR) en el que al menos una cadena constante de TCR es una cadena híbrida. Un SIR de cadena híbrida o un SAR de cadena híbrida puede tener ambas cadenas TCR que sean híbridas.

[00182] "Célula efectora inmunitaria", tal como se utiliza ese término en el presente documento, se refiere a una célula que participa en una respuesta inmunitaria, *p.ej.*, en la promoción de una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de células efectoras inmunitarias incluyen células T, *p.ej.*, células T alfa/beta y células T gamma/delta, células B, las células asesinas naturales (NK), las células T asesinas naturales (NKT), mastocitos, monocitos/macrófagos y fagocitos derivados de mieloides.

[00183] "Función efectora inmunitaria" o "respuesta efectora inmunitaria", "función efectora" se refiere a la función especializada de una célula diferenciada. La función efectora de una célula T o NK, *p.ej.*, puede ser la actividad citolítica o la actividad de ayuda, incluida la secreción de citocinas. Por ejemplo, una función o respuesta inmunitaria efectora se refiere a una propiedad de una célula T o NK que promueve la muerte o la inhibición del crecimiento o la proliferación de una célula diana.

[00184] Un "dominio de señalización intracelular" (DSI) o "dominio de activación", tal y como se utiliza el término en el presente documento, se refiere a una porción de señalización intracelular de una molécula.

[00185] El término "aislado", tal y como se utiliza aquí, se refiere a moléculas o materiales biológicos o celulares que están sustancialmente libres de otros materiales.

[00186] Un "enlazador largo" o "dominio enlazador largo" es un enlazador que tiene entre 25 y 500 aminoácidos de longitud. En una realización, un enlazador largo tiene entre 25 y 500 aminoácidos y cualquier número intermedio de longitud. En una realización, un enlazador largo tiene entre 25 y 125 aminoácidos de longitud. En una realización, un enlazador largo tiene entre 50 y 150 aminoácidos de longitud.

[00187] En una realización, el enlazador codifica o comprende un dominio de inmunoglobulina (Ig) o un dominio similar a Ig o un fragmento del mismo. Los términos

"dominio Ig", "dominio enlazador Ig", "dominios similares a Ig" o "dominios enlazadores similares a Ig" se utilizan indistintamente en la presente divulgación. Los dominios enlazadores de Ig de ejemplo son IgCL (SEQ ID NO:8961) e IgG1-CH1 (SEQ ID NO:8962). Otros ejemplos de enlazadores de Ig se presentan en SEQ ID NO (PRT): 8962-8976.

[00188] En algunas realizaciones, los enlazadores peptídicos se derivan de regiones constantes de subunidades TCR. En una realización, el enlazador comprende el dominio constante similar a Ig de una cadena TCR y comprende además un péptido de conexión TCR. Los ejemplos de enlazadores similar a Ig largos se proporcionan en SEQ ID NO: 22827-22829, 22833-22835, 22839-22840, 22843-22844, respectivamente y también incluyen variantes funcionales y homólogos que codifican para polipéptido con al menos 75% de identidad de secuencia a un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias anteriores. En una realización, el enlazador similar a Ig largo comprende mutantes de delección N-terminal o C-terminal de en SEQ ID NO: 22827-22829, 22833-22835, 22839-22840, 22843-22844, respectivamente, en los que se eliminan entre 1-40 (*p.ej.*, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40) residuos de aminoácidos N-terminal o C-terminal.

[00189] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "enlazador" (también "dominio enlazador" o "región enlazadora") se refiere a un oligo o un polipéptido (o un oligo que codifica el polipéptido) que une dos o más dominios o regiones de un polinucleótido o polipéptido SAR, respectivamente, divulgados en el presente documento. El enlazador puede tener de 1 a 500 aminoácidos de longitud o de 3 a 1500 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el "enlazador" es escindible o no escindible. Los módulos enlazadores también se refieren a los enlazadores de TCR y anticuerpos presentados en la **Tabla 7** de la solicitud de patente provisional.

[00190] El término "lentivirus" se refiere a un género de la familia Retroviridae. El término "vector lentiviral" se refiere a un vector derivado de al menos una parte del genoma de un lentivirus, incluyendo especialmente un vector lentiviral autoinactivable.

[00191] Un "interruptor polivalente" o "gen polivalente" codifica para una proteína que proporciona funciones suicidas, de supervivencia y marcadoras. En una realización, todas las funciones anteriores son proporcionadas por una única cadena polipeptídica. Algunos ejemplos de conmutadores polivalentes son IL2-tBCMA, IL15-tBCMA, IL2-RQR8 e IL2-tHer2, etc.

[00192] Por "receptor sintético multicadena de antígenos" "SAR multicadena" se entiende un receptor sintético de antígenos que comprende dos o más cadenas polipeptídicas. Un SAR multicadena puede ser un SAR de doble cadena. Un SAR de doble cadena comprende dos dominios asociados a membrana (*p.ej.*, dominios transmembrana o de anclaje de membrana).

[00193] "Nativo" o "de origen natural" o "endógeno", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un gen, proteína, ácido nucleico (*p.ej.*, ADN, ARN, etc.) o fragmento del mismo que es nativo de una célula o se expresa de forma natural en una célula. Así, un polipéptido de cadena TCR α nativo o endógeno de una célula T consiste en un dominio variable (V α) unido a una cadena constante TCR α .

[00194] "Receptor nativo" o "Receptor natural" o "Receptor endógeno" o "Receptor nativo", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier receptor que se encuentre en la naturaleza y que comprenda un dominio de unión a antígeno o un dominio de unión a ligando. El término incluye variantes funcionales, isoformas y homólogos de otras especies de mamíferos. Un receptor nativo puede ser un "receptor de señalización nativo" o un "receptor de señalización natural" si es capaz de transmitir una señal celular al unirse a su diana. Un receptor natural o un receptor nativo es nativo de una célula o se expresa de forma natural en una célula. Ejemplos de receptores de señalización naturales o receptores nativos incluyen, entre otros, CD16A, CD16B, NKp30, NKp44, NKp46, KIR2DS4, NKG2D, etc. A efectos de la presente divulgación, las cadenas de señalización CD3 (CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ y CD3 ζ) no se incluyen en la definición de "receptor natural" y se clasifican en cambio como adaptador de señalización.

[00195] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "receptor natural no-TCR" o "receptor de señalización natural no-TCR" o "receptor no-TCR" o "receptor de señalización no-TCR" se refiere a un receptor que no es un receptor de células T (TCR). Un receptor no-TCR puede expresarse en células distintas de una célula T. Un receptor no-TCR puede expresarse en células que carecen de la expresión de las cadenas CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 δ y/o CD3 γ .

[00196] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "módulo no receptor de células T" o "módulo no-TCR" o "módulo de señalización no-TCR" o "NTCRM" se refiere a un módulo que carece de secuencias comprendidas en los dominios transmembrana del receptor de células T y puede carecer además de todos o parte de los péptidos conectores del receptor de células T y/o dominios intracelulares. Un NTCRM carece de secuencias comprendidas en los dominios transmembrana de TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α . Un NTCRM puede carecer además de todos o parte de los péptidos conectores y/o dominios intracelulares de TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α . Un ejemplo de módulo no-TCR (NTCRM) comprende dos dominios transmembrana CD3z. Otro ejemplo de NTCRM comprende un dominio transmembrana CD3z y un dominio transmembrana CD16.

[00197] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "módulo adaptador no-CD3" o "adaptador no-CD3" o "adaptador no-TCR/CD3" o "adaptador de señalización no-TCR/CD3" o "NCAM" se refiere a un adaptador de señalización que no es un componente del complejo receptor de células T/receptor CD3. En una realización, un "adaptador no-TCR/CD3"

no comprende las regiones transmembrana y/o citosólica de las cadenas CD3 ϵ , CD3 ζ , CD3 γ o CD3 δ o variantes de las mismas.

[00198] El término "cerca del N-terminal", tal como se utiliza aquí, significa dentro de los 30 aminoácidos N-terminales. Por ejemplo, el término "un AABD unido de forma operable al N-terminal o cerca del N-terminal de un dominio vL y/o vH", significa un AABD que está unido de forma operable al N-terminal de un fragmento vL o vH o unido de forma operable al N-terminal 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25 o 30 aminoácidos que comprenden el dominio vL o vH. Del mismo modo, el término "un AABD unido de forma operable al N-terminal o cerca del N-terminal de un dominio Va y/o Vb", significa un AABD que está unido de forma operable al N-terminal de un fragmento Va o Vb o unido de forma operable al N-terminal 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 30 aminoácido que comprende el dominio Va o Vb. Un AABD de la divulgación puede estar enlazado de forma operable con el extremo N-terminal de otro dominio o cerca de él, ya sea directamente o a través de una secuencia enlazadora intermedia.

[00199] Tal como se utiliza en el presente documento, "receptor de células asesinas naturales" o "receptor NK" se refiere a un receptor de superficie celular que se expresa en las células asesinas naturales (NK).

[00200] Tal y como se utiliza en el presente documento, "células asesinas naturales" ("células NK") se refiere a un tipo de linfocito citotóxico del sistema inmunitario.

[00201] Tal y como se utiliza aquí, un "agente no natural" o "no nativo" o "exógeno" se refiere a un agente que no se expresa de forma natural en una célula. Dicho de otro modo, el agente no natural se "diseña" para que se exprese en una célula. Un agente no natural puede ser una versión clonada de un agente natural. Algunos ejemplos de agentes no naturales son los SAR (*p.ej.*, CAR, SIR, Ab-TCR, TFP, TCR recombinante). Un agente no natural puede expresarse en una célula mediante técnicas de transferencia génica conocidas en la técnica, como la transferencia génica mediada por lentivirus o retrovirus.

[00202] Tal y como se utiliza en el presente documento, un "receptor inmunitario no natural" o "receptor inmunitario exógeno" "receptor no natural" se refiere a un receptor inmunitario que no se expresa de forma natural en una célula inmunitaria. Dicho de otro modo, el receptor inmunitario no natural se "diseña" para que se exprese en una célula inmunitaria. Un ejemplo de receptor inmunitario no natural es un SAR (*p.ej.*, CAR de segunda generación, SIR, cTCR, STAR, zSIR, Ab-TCR, TFP y TCR recombinante).

[00203] Tal como se utiliza en el presente documento, un "dominio de unión a antígeno de TCR no natural" o "dominio de unión a antígeno de TCR exógeno" se refiere a un dominio de unión vinculado operablemente a una región constante de TCR que es quimérico y no natural

con respecto a un TCR presente en la naturaleza. Dicho de otro modo, el dominio de unión a antígeno del TCR que no se encuentra en la naturaleza se "diseña" mediante técnicas de biología molecular recombinante para que esté unido de forma operativa a un TCR y, además, que el dominio de unión a antígeno se obtenga o derive de una molécula que sea distinta de un TCR que se encuentre en la naturaleza. Un dominio de unión a antígeno que es distinto de un TCR en la naturaleza incluye anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, fragmentos vH y vL, scFv, fragmentos de anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos quiméricos, adaptadores, andamiaje de unión a antígeno no inmunoglobulina, receptor, ligandos y similares.

[00204] En el presente documento, un "dominio de unión a antígeno no natural" o "dominio extracelular de unión a antígeno no natural" o "dominio heterólogo de unión a antígeno" se refiere a un dominio de unión a antígeno que no forma parte de un receptor natural. Algunos ejemplos de dominios heterólogos de unión a antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (*p.ej.*, vL, vH, scFv, Fab, F(ab)2, etc.), anticuerpos de dominio único (*p.ej.*, sVH, FHVH, vHH, etc.), dominios de unión a antígeno no inmunoglobulina, TCR de dominio único variable (svd-TCR), TCR recombinantes, TCR independientes de HLA, scTCR, epítomos, adaptadores, ligandos y receptores.

[00205] El término "dominio de unión a antígeno no-TCR" se refiere a un dominio de unión a antígeno que no es un dominio de unión a antígeno-TCR. Un dominio de unión a antígeno no-TCR es estructuralmente distinto de los dominios variables (es decir, V α , V β , V γ y V δ) que se encuentran en un TCR. Un dominio de unión a antígeno no-TCR no incluye los dominios variables (es decir, V α , V β , V γ y V δ) presentes en un TCR en la naturaleza. Un dominio de unión a antígeno no-TCR tampoco incluye los dominios variables (es decir, V α , V β , V γ y V δ) TCR generados mediante técnicas de biología molecular recombinante. Ejemplos de dominios de unión a antígeno no-TCR incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (*p.ej.*, vL, vH, scFv, Fab, F(ab)2, etc.), anticuerpos de dominio único (*p.ej.*, sVH, FHVH, vHH, etc.), fragmentos de anticuerpos quiméricos, adaptadores, andamiaje de unión a antígeno no inmunoglobulina (*p.ej.*, DARPIN, centyrina, dominios D, etc.), adaptadores, dominios de unión Fc extracelulares de receptores (*p.ej.*, CD16, CD64, etc.), ligandos, citoquinas y similares.

[00206] El término "enlazado operablemente" o "enlazado funcionalmente" o "enlazado operacionalmente" se refiere a la vinculación o asociación funcional entre un primer componente y un segundo componente de forma que cada componente pueda ser funcional.

[00207] "Porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (*p.ej.*, 60% de identidad, opcionalmente 70%, 71%.

72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad en una región específica o, cuando no se especifica, en toda la secuencia), cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia en una ventana de comparación, o región designada según se mida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene al menos unos 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más típicamente sobre una región que tiene de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

[00208] Dos ejemplos de algoritmos que pueden utilizarse para determinar el porcentaje de identidad y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; y Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. Los programas informáticos para realizar análisis BLAST están a disposición del público a través del National Center for Biotechnology Information.

[00209] Ejemplos no limitantes de antígenos diana se enumeran en la **Tabla B**. Un SAR de la divulgación puede unirse a uno o más (*p.ej.*, 2, 3, 4, 5 o más) antígenos diana enumerados en la **Tabla B** directamente o a través de adaptadores SAR descritos en el presente documento.

[00210] TABLA B

TABLA B: Ejemplos de antígenos dirigidos por anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (<i>p.ej.</i>, scFv), AABD (<i>p.ej.</i>, FHVH, vHH, Darpin, centyrina, dominios D, adaptadores, etc.) y SARS
CD19; CD5; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (CRACC, SLAMF7, CD319 y 19A24); CD45, molécula-1 similar a lectina de tipo C (CLL-1 o CLECL1); CD33; receptor del factor de crecimiento epidérmico variante III (EGFRviii); gangliósido G2 (GD2); gangliósido GD3; miembro de la familia del receptor del TNF maduración de células B (BCMA); antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAc α -Ser/Thr)); antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA); receptor huérfano 1 similar a la tirosina quinasa (ROR1); tirosina quinasa 3 similar a Fms (FLT3); glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72); CD38; CD44v6; un epítipo CD43 glicosilado expresado en leucemia aguda o linfoma pero no en progenitores hematopoyéticos; un epítipo CD43 glicosilado expresado en cánceres no hematopoyéticos; antígeno carcinoembrionario (CEA); molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); subunidad alfa-2 del receptor de interleucina 13 (IL-13Ra2 o CD213A2); mesotelina; receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre prostáticas (PSCA); receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); antígeno Lewis(Y); CD24; receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); antígeno embrionario específico de estadio-4 (SSEA-4); CD20; receptor alfa del folato; receptor tirosina-proteína cinasa ERBB2 (Her2/neu); mucina 1, asociada a la

superficie celular (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión celular neural (NCAM); anhidrasa carbónica IX (CAIX); tirosinasa; fucosil GM1; molécula de adhesión sialil Lewis (sLe); gangliósido GM3; transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR); receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D); marco de lectura abierta 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; linfoma anaplásico quinasa (ALK); antígeno de diferenciación de la glándula mamaria (NY-BR-1); proteína del tumor de Wilms (WT1); antígeno 1 del cáncer/testículo (NY-ESO-1); antígeno 1 asociado al melanoma (MAGE-A1); antígeno del melanoma reconocido por células T 1 (MelanA o MARTI); mutante del sarcoma de rata (Ras); transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT); virus del papiloma humano E6 (VPH E6); virus del papiloma humano E7 (VPH E7); CD79a; CD79b; CD72; receptor 1 similar a la inmunoglobulina asociada a leucocitos (LAIR1); miembro A de la familia 12 de dominios de lectina de tipo C (CLEC12A); EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2 (EMR2); Lymphocyte antigen 75 (LY75); Glypican-3 (GPC3); Fc receptor-like 5 (FCRL5); inmunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (IGLL1); Biotin; c-MYC epitope Tag; CD34; LAMP1 TROP2; GFRalpha4; CDH17; CDH6; CDH19; CD200R; Slea (CA19.9; Sialyl Lewis Antigen) Fucosyl-GM1; PTK7; CDH1-CD324; DLL3; CD276/B7H3; IL11Ra; IL13Ra2; CD179b-IGLL1; ALK, TCR-gamma-delta; NKG2D; CD32 (FCGR2A); CSPG4-HMW-MAA; Tim1-/HVCR1; CSF2RA (GM-CSFR-alfa); TGFbetaR2; VEGFR2/KDR; Lewis Ag; cadena TCR-alfa, cadena TCR-beta1; cadena TCR-beta2; cadena TCR-gamma; cadena TCR-delta; FITC; Receptor de la hormona leutenizante (LHR); Receptor de la hormona foliculoestimulante (FSHR); Receptor de la hormona gonadotropina coriónica (CGHR); CCR4; GD3; SLAMF6; SLAMF4; Glicoproteína de la envoltura del VIH1; HTLV1-Tax; CMV pp65; EBV-EBNA3c; Hemaglutinina (HA) de la gripe A; GAD; PDL1; Guanilil ciclase C (GCC); Proteína KSHV-K8.1; proteína KSHV-gH; autoanticuerpo contra desmogleína 3 (Dsg3); autoanticuerpo contra desmogleína 1 (Dsg1); HLA-A2; HLA-A2:01, HLA-B; HLA-C; HLA-DP; HLA-DM; HLA-DOA; HLA-DOB; HLA-DQ; HLA-DR; HLA-G; IGE; CD99; Lym1; Lym2; RAS G12V; factor tisular 1 (TF1); AFP; GPRC5D; claudin18.2 (CLDN18A2 O CLDN18A.2); STEAP1; STEAP2, LIV1; NECTIN-4; CRIPTO; GPA33; BST1/CD157; canal de cloruro de baja conductancia; TAJ/TNFRSF19, MPL (TPO-R), KIR3DL2, CD32b, CD229, Toso, BAFF-R, OR2H1, p95-Her2, huTAG2, cadena ligera de inmunoglobulina kappa, cadena ligera de inmunoglobulina gamma, glicoproteína de espiga SARS-cov2, dominio de unión al receptor SARS-cov2, CSF1R, p53 mutante, p53-R175H mutante, p53-R248Q mutante, NPM1c, PRAME1, antígeno 4 asociado a melanoma (MAGE-A4), gp100, IL23R, MYCN y glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG).

[00211] Tal como se utiliza aquí, el término "receptor" se refiere a un polipéptido, o porción del mismo, presente en una membrana celular que se une selectivamente a uno o más ligandos.

[00212] Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "región" o "porción" cuando se utilizan en referencia a una molécula de ácido nucleico se refieren a un conjunto de nucleótidos enlazados que es inferior a la longitud total de la molécula, como una región de señalización CD3ζ descrita en el presente documento.

[00213] El término "vector retrovílico" se refiere a un vector derivado de al menos una parte del genoma de un retrovirus. Algunos ejemplos de vector retrovílico son el MSCVneo o el MSCVpac.

[00214] El término "SAR" o "receptor sintético de antígeno", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier receptor de unión a antígeno no nativo que se expresa en la superficie de una célula (*p.ej.*, una célula inmunitaria). El "receptor sintético de antígeno" o "SAR" es un receptor no natural o un receptor sintético que puede expresarse en la superficie de una célula y comprende al menos un dominio heterólogo de unión a antígeno y al menos un dominio asociado a membrana, en el que el dominio asociado a membrana puede ser un dominio transmembrana o un dominio de anclaje a membrana (es decir, un dominio unido a GPI). El dominio de unión a antígeno del SAR es heterólogo a su dominio asociado a membrana, es decir, el dominio de unión a antígeno se deriva de una fuente diferente que el dominio asociado a membrana. Un SAR puede comprender además un dominio bisagra, un dominio de unión a ligando extracelular y/o un dominio citosólico opcional. En una realización, un SAR comprende un polipéptido o un conjunto de polipéptidos, que cuando se expresan en una célula efectora, proporcionan a la célula especificidad para una célula diana, típicamente una célula cancerosa, y con generación de señal intracelular. Un SAR puede ser de cadena única, de dos cadenas o de más de dos cadenas. Un SAR puede ser uniespecífico, biespecífico o multiespecífico. Un SAR puede tener uno o más dominios heterólogos de unión a antígeno. El término SAR comprende los CAR convencionales (*p.ej.*, CARs de 2ª generación que comprenden dominios coestimuladores 41BB o CD28 y dominio de activación CD3z) y también abarca enfoques más nuevos para conferir especificidad de antígeno a las células, como moléculas quiméricas Anticuerpo-TCR o Ab-TCR (WO 2017/070608 A1 incorporado aquí por referencia), proteínas de fusión de receptores TCR o TFP (WO 2016/187349 A1 incorporado aquí por referencia), receptores inmunitarios sintéticos (SIR) (véase, WO 2018/102795 A1, incorporado aquí por referencia), STAR (véase, WO 2020/029774), TCR independiente de HLA (véase, WO2019157454A1), acoplador trifuncional de antígenos de células T (Tri-TAC o TAC) (véase, WO 2015/117229 A1, incorporado aquí por referencia) y zSIR (véase, PCT/US2019/035096, incorporado aquí por referencia). Los SAR biespecíficos y multiespecíficos se han descrito en el documento PCT/US2021/022641. El término "SAR" abarca los CAR, así como otros receptores de unión a antígeno, incluidos, entre otros, los TCR recombinantes. El SAR también comprende

composiciones que comprenden una o más regiones derivadas de CD16A, CD16B, CD3ζ, DAP10, DAP12, FcRγ, TCRαβ y TCRγδ etc. y variantes y fragmentos de las mismas. La presente divulgación proporciona SAR que comprenden variantes funcionales de los genes y/o proteínas anteriores incluyen isoformas empalmadas alternativas, cadenas híbridas y homólogos de otras especies. Las regiones o fragmentos de ejemplo de los genes y proteínas anteriores que pueden utilizarse en la construcción de los SAR de la divulgación se proporcionan en las **Tablas 7 y 22** de la solicitud de patente provisional. El SAR también puede construirse con polipéptidos o fragmentos que tengan homología del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% con cualquiera de los fragmentos proporcionados en las **Tablas 7 y 22** de la solicitud de patente provisional. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de componentes adicionales de ejemplo (*p. ej.*, vL, vH, scFv, vHH, etc.) que pueden utilizarse en la construcción de SAR se proporcionan en las **Tablas 3-6**. El SAR también puede construirse con polipéptidos o fragmentos que tengan homología del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% en las regiones marco de cualquiera de los fragmentos proporcionados en las **Tablas 3-6** y que comprendan regiones CDR de cadena ligera y cadena pesada con no más de una sustitución de aminoácidos de las regiones CDR de los fragmentos de unión a antígeno (*p. ej.*, vL, vH, scFv, vHH y FHVH etc.) enumerados en las **Tablas 3-6**. Los SAR de ejemplo de la divulgación se proporcionan en las **Tablas 8-20 y 23-25** de la solicitud de patente provisional. Los SAR tienen un diseño modular y se pueden construir SAR adicionales intercambiando un módulo del SAR por otro diferente. La expresión y la actividad de estos nuevos SAR pueden probarse utilizando los métodos descritos en la divulgación para seleccionar los SAR con actividades funcionales óptimas.

[00215] El término "receptor sintético de antígeno de cadena simple" o "SAR de cadena simple" se refiere a un receptor sintético de antígeno que comprende una cadena polipeptídica simple. Ejemplos de tales SAR se proporcionan en SEQ ID NO: 1392-2234 y en la **Tabla 10** de la solicitud de patente provisional.

[00216] Por "receptor sintético de antígeno de doble cadena" o "SAR de doble cadena" significa un receptor sintético de antígeno que comprende dos cadenas polipeptídicas en las que cada cadena comprende al menos un dominio de unión a antígeno y una cadena de señalización. Ejemplos de SAR de doble cadena incluyen receptores inmunes sintéticos (SIR) (véase, WO 2018/102795 A1, incorporado aquí por referencia), y zSIR (véase, PCT/US2019/035096, incorporado aquí por referencia). Los SIR biespecíficos y multiespecíficos se han descrito en el documento PCT/US2021/022641.

[00217] El término "receptor de antígeno sintético de cadena y media" significa un receptor de antígeno sintético que comprende dos cadenas polipeptídicas en las que una cadena

comprende al menos un dominio de unión a antígeno y una cadena de señalización (*p.ej.*, cadena constante TCR α) y la otra cadena comprende una cadena de señalización (*p.ej.*, cadena constante TCR β) pero carece de un dominio de unión a antígeno. Los SAR de cadena y media de ejemplo incluyen receptores inmunes sintéticos (SIR) (véase, WO 2018/102795 A1, incorporado en el presente documento por referencia). Los SAR de cadena y media de ejemplo se presentan en SEQ ID NO: 50061 y 50062.

[00218] Normalmente, se utiliza el término "SAR-T" para referirse a las células T que han sido modificadas para expresar un receptor de antígeno sintético. El término "SAR-NK" se refiere a una célula NK que ha sido diseñada para expresar un SAR.

[00219] El término "receptor inmune sintético" o alternativamente un "SIR" se refiere a un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en algunas realizaciones, que cuando se expresa en una célula efectora, proporciona a la célula especificidad para una célula diana, típicamente una célula cancerosa, y con generación de señal intracelular. Los SIR representan plataformas CAR de próxima generación que se describen en el documento WO 2018/102795 A1 que se incorpora al presente documento por referencia. En una realización típica, un SIR comprende uno o más dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un ligando o un receptor) que se unen a antígenos como se describe en el presente documento y se unen a una o más cadenas o regiones constantes del receptor de células T a través de un enlazador opcional. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos es contiguos entre sí. En algunas realizaciones, un SIR comprende dos o más conjuntos de dos o más polipéptidos. Los polipéptidos de cada conjunto de SIR son contiguos entre sí (unidad funcional polipeptídica 1) pero no son contiguos con los polipéptidos del otro conjunto (unidad funcional polipeptídica 2). En algunas realizaciones, las cadenas (o regiones) constantes del receptor de células T del SIR se eligen de la cadena constante del receptor de células T humano-alfa (TCR-alfa o TCR α o TCRA o hTCR-alfa o hTCR α o hTCRA o C α), receptor humano de células T-beta1 (TCR-beta1 o TCR β 1 o TCRb1 o hTCR-beta1 o hTCR β 1 o hTCRb1 o C β 1), receptor humano de células T-beta 2 (TCR-beta2 o TCR β 2 o TCRb2 o hTCR-beta2 o hTCR β 2 o hTCRb2 o C β 2 también designado TCR-beta, TCR β o TCRb o C β), receptor de células pre-T humano alfa (preTCR-alfa o pre-TCR α o preTCRA o preC α), receptor de células T humano-gamma (TCR-gamma o TCR γ o TCRg o hTCR-gamma o hTCR γ o hTCRg o hTCR γ 1 o hTCRgamma1, o C γ), o receptor de células T humano-delta (TCR-delta o TCRd o TCR δ o hTCR-delta o hTCRd o hTCR δ o C δ). En algunas realizaciones, las cadenas constantes TCR de SIR están codificadas por sus secuencias de nucleótidos de tipo salvaje, mientras que en otros aspectos las cadenas constantes TCR de SIR están codificadas por las secuencias de nucleótidos que no son de tipo salvaje. En algunas realizaciones, las cadenas constantes del TCR del SIR están codificadas por sus secuencias

humanas de codón optimizado. En algunas realizaciones, las cadenas constantes TCR de SIR codifican para las secuencias de polipéptidos de tipo salvaje, mientras que en otras realizaciones las cadenas constantes TCR de SIR codifican para polipéptidos que llevan una o más mutaciones. En algunas realizaciones, las cadenas constantes TCR de SIR están codificadas por sus secuencias optimizadas de codón que llevan una o más mutaciones.

[00220] El término "cadena constante del TCR" o "región constante del receptor de células T" se define como la cadena constante de TCR α /TCR α , TCR β 1/TCR β 1, TCR β 2/TCR β 2, TCR γ /TCR δ , TCR δ /TCR δ y pre-TCR α . Los ejemplos de cadenas constantes de TCR se enumeran en la **Tabla 9B** de la solicitud actual y en la **Tabla 12** de la solicitud de patente provisional. Una cadena constante de TCR puede dividirse en varios subdominios, tales como el dominio C1 similar a Ig (*p.ej.*, SEQ ID NO: 1168-1175; **Tabla 13** de la solicitud de patente provisional), péptido conector (*p.ej.*, SEQ ID NO: 1177-1184; **Tabla 9B** y **Tabla 14** de la solicitud de patente provisional), dominio transmembrana (SEQ ID NO:1187-1190; **Tabla 9B** de la solicitud actual y **Tabla 15** de la solicitud de patente provisional), y dominio citosólico (*p.ej.*, SEQ ID NO: 1193-1196; **Tabla 16** de la solicitud de patente provisional). Los dominios citosólicos de las cadenas TCR α , TCR β 1/ β 2, TCR γ y TCR δ son cortos y generalmente no se cree que desempeñen ningún papel significativo en sus actividades de señalización.

[00221] El término "región variable de cadena única" o "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada.

[00222] En el presente documento, los términos "se une específicamente" o "es específico para" se refieren a interacciones mensurables y reproducibles, como la unión entre una diana y un anticuerpo o una fracción de anticuerpo, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluidas moléculas biológicas.

[00223] El término "dominio de señalización" se refiere a la región funcional de una proteína que transmite información dentro de la célula para regular la actividad celular a través de vías de señalización definidas generando segundos mensajeros o funcionando como efectores al responder a dichos mensajeros.

[00224] El término "módulo de señalización" se refiere a una molécula o complejo molecular que comprende uno o más mediadores de señalización o adaptadores de señalización capaces de iniciar una señal celular.

[00225] El término "mediador de señalización" o "adaptador de señalización" se refiere a una molécula capaz de iniciar o inhibir una señal celular cuando es reclutada por un receptor de señalización natural o no natural. A diferencia de un receptor de señalización, un adaptador de

señalización carece de su propio dominio de unión a antígeno o dominio de unión a ligando. Algunos ejemplos de adaptadores de señalización son CD3 ζ (CD3z), FcR γ , DAP10, DAP12, CD3 ϵ , CD3 γ y CD3 δ .

[00226] El término "cadena de señalización" o "fragmento de señalización" se refiere a un polipéptido que comprende la región transmembrana y/o intracelular y, opcionalmente, las regiones extracelulares bisagra/péptido conector de un receptor de señalización celular. Las cadenas de señalización de ejemplo incluyen las cadenas constantes de TCR α , TCR β , TCR γ y TCR δ . Otros ejemplos de cadenas de señalización incluyen cadenas que comprenden las regiones transmembrana y/o intracelular de CD16, NKp30, NKp44, NKp46, DAP10, DAP12, DNAM-1, NKG2D, CD32, CD64, KIR3DL1, KIR2DS4, FcR γ y CD3z.

[00227] El término dominio SVH, tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo de dominio V_H humano único (V_H sdAb). Por lo tanto, estos términos se utilizan indistintamente. El término SVH también se utiliza indistintamente con dominios vH independientes. Un ejemplo de un SVH es un dominio vH totalmente humano (FHVH) presentado en SEQ ID NO (DNA): 425-426 y SEQ ID NO (PRT): 8805-8806.

[00228] El término "sujeto" incluye a los organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria (*p.ej.*, cualquier mamífero domesticado o un ser humano).

[00229] Como se utiliza en el presente documento, el término "TCR" o "receptor de células T" se refiere a una proteína de señalización heteróloga dimérica de la superficie celular que forma un receptor alfa-beta o gamma-delta típicamente implicado en el reconocimiento de un antígeno presentado por una molécula MHC (es decir, reconocimiento de antígenos en el contexto de una molécula MHC).

[00230] Como se utiliza en el presente documento, el término "cadena constante del TCR" se refiere a la cadena constante TCR α , TCR β 1, TCR β 2, TCR γ , TCR δ y pre-TCR α y variantes funcionales, mutantes, isoformas empalmadas alternativas y homólogos de especies no humanas. Una cadena constante de TCR carece del dominio variable de unión a antígeno, pero comprende el dominio similar a Ig, el péptido conector (o dominio bisagra), el dominio transmembrana y un dominio intracelular o citosólico opcional.

[00231] Tal y como se utiliza aquí, el término "linfocito T" o "célula T" se refiere a una célula que expresa CD3 (CD3+) y un receptor de células T (TCR+).

[00232] El término "célula no T" se refiere a una célula que no es una célula T. En una realización, una célula no T carece de la expresión de CD3 en la superficie celular y de un receptor de células T. En una realización, una célula no T no responde a un anticuerpo activador de células T, como OKT3. En una realización, una célula no T no responde a un anticuerpo activador de células T, como OKT3. En una realización, una célula no T carece de expresión

superficial de CD3. En una realización, una célula no T carece de la expresión de una o más cadenas CD3 seleccionadas del grupo de CD3 ϵ , CD3 γ y CD3 δ . Un ejemplo de célula no T incluye una célula NK, una célula B, un macrófago, un granulocito, una célula dendrítica y una célula epitelial. Una célula no T puede ser una línea celular inmortalizada.

[00233] El término "módulo receptor de células T", o "TCRM", hace referencia a un heterodímero que comprende secuencias derivadas de un receptor de células T. El TCRM comprende dominios transmembrana del receptor de células T y puede comprender además la totalidad o una parte de péptidos conectores del receptor de células T y/o dominios intracelulares.

[00234] El término "TCRM canónico" se refiere a un TCRM que se forma por heterodimerización entre cadenas TCR canónicas, es decir, cadenas TCR α y TCR β 1 o TCR β 2, cadenas TCR γ y TCR δ , y cadenas pre-TCR α y TCR β 1 o β 2. Además, un TCRM canónico se refiere a un TCRM que se forma entre dos cadenas de TCR que pertenecen a la misma especie (*p.ej.*, humano, ratón, etc.). Por ejemplo, un TCRM canónico se forma por heterodimerización de una primera cadena polipeptídica que comprende el péptido de conexión, los dominios transmembrana e intracelular del TCR humano α y una segunda cadena polipeptídica que comprende el péptido de conexión, los dominios transmembrana e intracelular del TCR humano β 1 o TCR β 2. Del mismo modo, un TCRM canónico se forma por heterodimerización de una primera cadena polipeptídica que comprende el péptido conector, los dominios transmembrana e intracelular del TCR humano γ y una segunda cadena polipeptídica que comprende el péptido conector, los dominios transmembrana e intracelular del TCR δ humano.

[00235] El término "TCRM no canónico" se refiere a un TCRM que no está formado por la heterodimerización entre cadenas TCR canónicas, es decir, cadenas TCR α y TCR β 1 o TCR β 2, cadenas TCR γ y TCR δ , y cadenas pre-TCR α y TCR β 1 o β 2. Un TCRM no canónico puede formarse por heterodimerización de las cadenas TCR α y TCR γ , y de las cadenas TCR β y TCR δ . También se forma un TCRM no canónico entre variantes de las cadenas TCR α , β , γ , y δ incluidos sus mutantes de delección y cadenas híbridas. Por ejemplo, un TCRM no canónico está formado por un HC-SAR (SEQ ID NO: 32272) que comprende una primera cadena que contiene el dominio constante y el péptido conector del TCR β fusionado en marco al dominio transmembrana e intracelular del TCR γ y la segunda cadena que es la cadena TCR α (SEQ ID NO: 8838).

[00236] El término "TCRM no canónico inter-especies" se refiere a un TCRM que se forma por heterodimerización de dos cadenas de TCR que pertenecen a especies diferentes (*p.ej.*, entre el TCR α humano y la cadena de TCR β de ratón). También se forma un TCRM no canónico

interespecífico cuando un componente de una cadena híbrida procede de una especie diferente. Por ejemplo, un TCRM inter-especies no canónico se forma por heterodimerización entre la cadena TCR α humana y una cadena TCR β híbrida que contiene el dominio constante del TCR β humano y el péptido conector, el dominio transmembrana y el dominio intracelular del TCR β de ratón.

[00237] El término "TCR-Fv" o "Fv-TCR" de "fragmento variable TCR", tal como se utiliza aquí, se refiere a un módulo de unión a antígeno que está formado por los dominios variables de las cadenas TCR. Un TCR-Fv puede estar formado por los dominios V α y V β o por los dominios V γ y V δ .

[00238] El término "Fv" o "fragmento variable", tal como se utiliza aquí, se refiere a un módulo de unión a antígeno que está formado por los dominios variables de un anticuerpo. Un Fv puede estar formado por los dominios vL y vH.

[00239] Tal como se utiliza en el presente documento, un "módulo transmembrana" o "TMM" se refiere a una molécula o un complejo molecular que comprende una proteína transmembrana (*p.ej.*, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ , CD16A o CD3z).

[00240] El término "módulo asociado a membrana" o "MAM" se refiere a una molécula o un complejo molecular que comprende una proteína transmembrana (*p.ej.*, CD16A, CD3 ζ) o una proteína anclada a membrana (*p.ej.*, CD16B). El término abarca proteínas transmembrana, como CD16A, CD3z (o CD3 ζ) y proteínas ligadas a GPI, como CD16B. Una MAM puede comprender además todos o porciones de dominios bisagra y/o dominios citosólicos.

[00241] "Agentes terapéuticos", tal y como se utilizan en el presente documento, se refiere a agentes que se utilizan, *p.ej.*, para tratar, inhibir, prevenir, mitigar los efectos de, reducir la gravedad de, reducir la probabilidad de desarrollar, ralentizar la progresión de y/o curar, una enfermedad.

[00242] "Controles terapéuticos", tal como se utilizan en el presente documento, se refiere a un elemento utilizado para controlar la actividad de una célula que expresa SAR. En la **Tabla 24** de la solicitud provisional se proporcionan ejemplos de controles terapéuticos.

[00243] El término "efecto terapéutico" se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por diversos medios, entre ellos, *p.ej.*, la disminución del volumen tumoral, la disminución del número de células cancerosas, etc.

[00244] La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" utilizada en el presente documento significa una cantidad suficiente de la composición para tratar un trastorno, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

[00245] El término "vector de transferencia" se refiere a una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede utilizarse para administrar el ácido nucleico

aislado al interior de una célula. En la técnica se conocen numerosos vectores, entre los que se incluyen polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados a compuestos iónicos, plásmidos y virus.

[00246] "Dominio transmembrana" (o dominio TM), tal como se utiliza aquí, se refiere a la región de un receptor, (*p.ej.*, un SAR) que atraviesa la membrana plasmática.

[00247] "Vector", "vector de clonación" y "vector de expresión", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren al vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia polinucleotídica (*p.ej.*, un gen extraño) en una célula huésped, con el fin de transformar el huésped y promover la expresión (*p.ej.*, la transcripción y la traducción) de la secuencia introducida. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, etc.

[00248] El término "vector viral" se refiere a un vector obtenido o derivado de un virus.

[00249] El término "zeta" o alternativamente "cadena zeta", "CD3-zeta" o "TCR-zeta" "CD3 ζ " se define como la proteína proporcionada como GenBank Ace. No. BAG36664.1, o los residuos equivalentes de una especie no humana, *p.ej.*, ratón, roedor, mono, simio y similares, y un "dominio estimulador zeta" o alternativamente un "dominio estimulador CD3-zeta" o un "dominio estimulador TCR-zeta" se define como los residuos de aminoácidos del dominio citoplasmático de la cadena zeta, o derivados funcionales de los mismos, que son suficientes para transmitir funcionalmente una señal inicial necesaria para la activación de células T.

[00250] Las **Tablas 9-20 y 23-25** de la solicitud de patente provisional resumen los antígenos diana, los ID de clon, los SEQ ID (DNA), los SEQ ID (PRT) y los nombres de varios SAR de ejemplo descritos en la presente divulgación. Estas construcciones se realizaron en general combinando los fragmentos de unión a antígenos descritos en las **Tablas 3-6** y en PCT/US22/17177 con cadenas de señalización de ejemplo descritas en el presente documento (incluidas las variantes proporcionadas en la **Tabla 7** de la solicitud de patente provisional). Los SAR se dividen en diferentes tipos basados en su arquitectura o columna vertebral; es decir, el tipo de cadena de señalización (*p.ej.*, cadena constante TCR, cadena CD16, cadena CD3z, etc.) presente en ellos. Sin embargo, debe entenderse que los SAR son de diseño modular y el alcance de la presente divulgación no se limita a los SAR descritos en las **Tablas 9-20 y 23-25** de la solicitud de patente provisional y es posible generar diferentes SAR cambiando los diferentes módulos. Así, es posible combinar los dominios de unión a antígeno con otras variantes de cadenas constantes de TCR, pero que no están incluidas en los SAR descritos en la **Tabla 7** de la solicitud de patente provisional. También es posible diseñar SAR utilizando dominios de unión a antígeno no incluidos en las **Tablas 3-6**. También es posible añadir o sustituir o eliminar los diferentes módulos terapéuticos y accesorios del SAR. Así, mientras que las **Tablas 9-20 y 23-25** de la solicitud de patente provisional contienen varios SAR con un gen

de resistencia a antibióticos (*p.ej.*, PAC), este módulo puede eliminarse o sustituirse por otros módulos terapéuticos y accesorios (*p.ej.*, IL12f, K13, MC159, icaspasa, etc.). Por último, otros SAR (*p.ej.*, CAR, TFP) pueden expresarse en combinación con los SAR descritos en el presente documento.

[00251] La solicitud de patente provisional de la presente divulgación proporciona SEQ ID NO de varios SAR y sus componentes en forma de tablas. Estas tablas pueden utilizarse para identificar un SAR que comprenda un dominio de unión a antígeno específico y que pertenezca a una arquitectura particular. Alternativamente, la secuencia de un SAR que contiene un dominio de unión a antígeno particular de esta divulgación puede determinarse mediante la búsqueda de homología del archivo de listado de secuencias que acompaña a esta divulgación. Por último, dado que los SAR tienen un diseño modular, la secuencia de ADN y aminoácidos de un SAR que contenga un módulo concreto puede generarse sustituyendo el módulo por el nuevo módulo.

TABLA 3

TABLE 3

TABLA 3								
ANTÍGEN O DIANA	NOMBRE	vL- SEQ ID NO (DNA)	vL-SEQ ID NO (PRT)		vH- SEQ ID NO (DNA)	vH-SEQ ID NO (PRT)	scFv- DNA SEQ ID NO	scFv- PRT SEQ ID
CD19	hu-mROO5-1	339	8719		363	8743		387 8767
CD45	CD45-CH	340	8720		364	8744		388 8768
Her2p95	Hup95Her2-USC1	341	8721		365	8745		389 8769
Her2p95	mu-p95Her2-USC2	342	8722		366	8746		390 8770
OR2H1	OR2H1-usc1	343	8723		367	8747		391 8771
OR2H1	R2PA1-usc2	344	8724		368	8748		392 8772
OR2H1	R2PA1-usc2	345	8725		369	8749		393 8773
CLDN-18-2	CLDN182-163E12	346	8726		370	8750		394 8774
CLDN-18-2	hu163E12-USC2	347	8727		371	8751		395 8775
DLL3	hSC16-57-USC1	348	8728		372	8752		396 8776
p53	p53-R248Q-336-USC1	349	8729		373	8753		397 8777
TAG72	huTAG72-v59-v15	350	8730		374	8754		398 8778
MSLN	MSLN-hu22A10	351	8731		375	8755		399 8779
PSMA	hu-PSMA-J591	352	8732		376	8756		400 8780
He2	huMab4D5-H91A	353	8733		377	8757		401 8781
BCMA	huUSC82-S29G	354	8734		378	8758		402 8782
BCMA	BCMA-3-USC2	19766	20386		19785	20405		19804 20424
BCMA	BCMA-57-USC3	19767	20387		19786	20406		19805 20425
CD70	CD70-AM13	19768	20388		19787	20407		19806 20426
CD70	CD70-AM16	19769	20389		19788	20408		19807 20427
CD70	Hu-CD70-2H5	19770	20390		19789	20409		19808 20428
CD70	huCD70-hu18E7	19771	20391		19790	20410		19809 20429

CD70	CD70-P08F09-USC1	19772	20392		19791	20411		19810	20430
CSF1R	CSF1R-AXI	19773	20393		19792	20412		19811	20431
CSF1R	CSF1R-AXI-USC1	19774	20394		19793	20413		19812	20432
STEAP2	RGN-7814N-USC1	19775	20395		19794	20414		19813	20433
STEAP2	STEAP2-RGN-1162-USC1	19776	20396		19795	20415		19814	20434
ALK	Alk-48	32912	40759		33121	41030		33330	41301
ALK	Alk-58	32913	40760		33122	41031		33331	41302
BCMA	BCMA-huC12A3	32914	40761		33123	41032		33332	41303
BCMA	BCMA-J6M0	32915	40762		33124	41033		33333	41304
CD123	CD123-CSL362	32916	40763		33125	41034		33334	41305
CD19	CD138	32917	40764		33126	41035		33335	41306
CD19	CD179b	32918	40765		33127	41036		33336	41307
CD19	CD19Bu12	32919	40766		33128	41037		33337	41308
CD19	FMC63	32920	40767		33129	41038		33338	41309
CD19	huFMC63-11	32921	40768		33130	41039		33339	41310
CD20	CD20-2F2	32922	40769		33131	41040		33340	41311
CD20	CD20-GA101	32923	40770		33132	41041		33341	41312
CD22	CD22-h10F4	32924	40771		33133	41042		33342	41313
CD276	CD276-17	32925	40772		33134	41043		33343	41314
CD30	CD30-5F11	32926	40773		33135	41044		33344	41315
CD30	CD30-Ac10	32927	40774		33136	41045		33345	41316
CD32	CD32-Med9	32928	40775		33137	41046		33346	41317
CD324	CD324-hSC10-17	32929	40776		33138	41047		33347	41318
CD324	CD324-SC10-6	32930	40777		33139	41048		33348	41319
CD33b	CD33-huMyc9	32931	40778		33140	41049		33349	41320
CD33	CD33-AF5	32932	40779		33141	41050		33350	41321
CD34	CD34-hu4C7	32933	40780		33142	41051		33351	41322
CD5	CD5-18	32934	40781		33143	41052		33352	41323
CD5	CD5-9	32935	40782		33144	41053		33353	41324
CD70	CD70-h1F6	32936	40783		33145	41054		33354	41325
CD79b	CD79b-2F2	32937	40784		33146	41055		33355	41326
CD79b	huMA79bv28	32938	40785		33147	41056		33356	41327
CDH17	PTA001A4	32939	40786		33148	41057		33357	41328
CDH19	CDH19-16A4	32940	40787		33149	41058		33358	41329
CDH6	CDH6-NOV710	32941	40788		33150	41059		33359	41330
CDH6	CDH6-NOV712	32942	40789		33151	41060		33360	41331
CLEC5A	CLEC5A-3E12A2	32943	40790		33152	41061		33361	41332
CLEC5A	CLEC5A-8H8F5	32944	40791		33153	41062		33362	41333
CLL1	CLL1-M26	32945	40792		33154	41063		33363	41334
CLL1	CLL1-M32	32946	40793		33155	41064		33364	41335
CS1	HuLuc64-[2]	32947	40794		33156	41065		33365	41336
CS1	huLuc90	32948	40795		33157	41066		33366	41337
CSF2RA	CSF2RA-Ab1	32949	40796		33158	41067		33367	41338
CSF2RA	CSF2RA-Ab6	32950	40797		33159	41068		33368	41339
DLL3	DLL3-hSC16-13	32951	40798		33160	41069		33369	41340
DLL3	DLL3-hSC16-56	32952	40799		33161	41070		33370	41341

EGFR	Cetuximab	32953	40800		33162	41071		33371	41342
EGFRviii	EGFRviii-2173	32954	40801		33163	41072		33372	41343
EpCAM	EpCam1-D5K5	32955	40802		33164	41073		33373	41344
EpCAM	Epcam1-MM1	32956	40803		33165	41074		33374	41345
FLT3	FLT3-NC7	32957	40804		33166	41075		33375	41346
VIH1-gp	VIH1-N6	32958	40805		33167	41076		33376	41347
FR1	FR1-huMov19	32959	40806		33168	41077		33377	41348
GD2	GD2-hu14-18	32960	40807		33169	41078		33378	41349
GD2	GD2-hu3F8	32961	40808		33170	41079		33379	41350
GD3	GD3-KM-641	32962	40809		33171	41080		33380	41351
GFR4	GFRAlpha4-P4-6	32963	40810		33172	41081		33381	41352
GM1	GM1-5B2	32964	40811		33173	41082		33382	41353
GPRC5D	ET150-18	32965	40812		33174	41083		33383	41354
GPRC5D	GPRC5D-ET150-5	32966	40813		33175	41084		33384	41355
Her2	Her2-Hu4D5	32967	40814		33176	41085		33385	41356
VIH1-gp100	VIH1-PGT-128	32968	40815		33177	41086		33386	41357
VIH1-gp100	VIH1-X5	32969	40816		33178	41087		33387	41358
IL11Ra	IL11Ra-8E2	32970	40817		33179	41088		33388	41359
IL13Ra2	IL13Ra2-hu107	32971	40818		33180	41089		33389	41360
IL13Ra2	IL13Ra2-Hu108	32972	40819		33181	41090		33390	41361
L1CAM	L1CAM-9-3-HU3	32973	40820		33182	41091		33391	41362
LAMP1	LAMP1-humab1-2	32974	40821		33183	41092		33392	41363
LAMP1	LAMP1-Mb4	32975	40822		33184	41093		33393	41364
Lym1	Lym1	32976	40823		33185	41094		33394	41365
Lym2	Lym2	32977	40824		33186	41095		33395	41366
MPL	MPL-111	32978	40825		33187	41096		33396	41367
MPL	MPL-161	32979	40826		33188	41097		33397	41368
MPL	MPL-161	32980	40827		33189	41098		33398	41369
MPL	MPL-175	32981	40828		33190	41099		33399	41370
TCRB1	TCRB1-E09	32982	40829		33191	41100		33400	41371
TCRB1	TCRB1-Jovi1	32983	40830		33192	41101		33401	41372
TCRB2	TCRB2-D05	32984	40831		33193	41102		33402	41373
TCRB2	TCRB2-E05	32985	40832		33194	41103		33403	41374
TCRgd	TCRgd-G5-4	32986	40833		33195	41104		33404	41375
TnAg	TnAg	32987	40834		33196	41105		33405	41376
Tn-Muc1	Tn-Muc1-hu5E5	32988	40835		33197	41106		33406	41377
TROP2	TROP2-	32989	40836		33198	41107		33407	41378
WT1/HLA2	WT1-Ab13	32990	40837		33199	41108		33408	41379
WT1/HLA	WT1-Ab15	32991	40838		33200	41109		33409	41380
WT1/HLA	WT1-Ab5	32992	40839		33201	41110		33410	41381
CD123	CD123-1172	32993	40840		33202	41111		33411	41382
CDH19	CDH19-4B10	32994	40841		33203	41112		33412	41383
FR-beta	FRbeta-m923	32995	40842		33204	41113		33413	41384
B7J4	B7H4-hu22Cl0	32996	40843		33205	41114		33414	41385
B7H4	B7H4-hu1D11	32997	40844		33206	41115		33415	41386

CD23	CD23-p5E8	32998	40845		33207	41116		33416	41387
CCG	GCC-Ab229	32999	40846		33208	41117		33417	41388
CD200R	CD200R-huDx182	33000	40847		33209	41118		33418	41389
AFP/HLA-A2	AFP-76	33001	40848		33210	41119		33419	41390
AFP/HLA-A2	AFP-79	33002	40849		33211	41120		33420	41391
BCMA	BCMA-ET-03	33003	40850		33212	41121		33421	41392
BCMA	BCMA-huC11.D5.3L1H3	33004	40851		33213	41122		33422	41393
BCMA	BCMA-huC13-F12	33005	40852		33214	41123		33423	41394
CD123	CD123-DART-1	33006	40853		33215	41124		33424	41395
CD123	CD123-DART-2	33007	40854		33216	41125		33425	41396
CD123	CD123-1176	33008	40855		33217	41126		33426	41397
CD123	CD123-2B8	33009	40856		33218	41127		33427	41398
CD123	CD123-9D7	33010	40857		33219	41128		33428	41399
CD123	CD123-3B10	33011	40858		33220	41129		33429	41400
CD19	CD19-MOR0028	33012	40859		33221	41130		33430	41401
CD19	hu-mROO5-1	33013	40860		33222	41131		33431	41402
CD20	CD20-Ubli-v4	33014	40861		33223	41132		33432	41403
CD20	CD20-7D8	33015	40862		33224	41133		33433	41404
CD33	CD33-SGNh2H12	33016	40863		33225	41134		33434	41405
CD99	CD99-hu12E7	33017	40864		33226	41135		33435	41406
CLL1	CLL1-21C9-L2H3	33018	40865		33227	41136		33436	41407
CLL1	CLL1-6E7L4H1e	33019	40866		33228	41137		33437	41408
CLL1	CLL1-hu1075-v1	33020	40867		33229	41138		33438	41409
CLL1	CLL1-hu1075-v2	33021	40868		33230	41139		33439	41410
FITC	FITC-4M-53	33022	40869		33231	41140		33440	41411
FITC	FITC-E2	33023	40870		33232	41141		33441	41412
GPRC5D	GPRC5D-ET150-1	33024	40871		33233	41142		33442	41413
GPRC5D	GPRC5D-ET150-2	33025	40872		33234	41143		33443	41414
HLA-A2	HLA-A2-3PB2	33026	40873		33235	41144		33444	41415
Kappa-LC	Kappa-LC1	33027	40874		33236	41145		33445	41416
CD19	hCD19-EUK5-13	33028	40875		33237	41146		33446	41417
Streptag	Streptag	33029	40876		33238	41147		33447	41418
MPL	Hu-161-2	33030	40877		33239	41148		33448	41419
MPL	MPL-hu-175-2	33031	40878		33240	41149		33449	41420
MPL	MPL-hu-111-2	33032	40879		33241	41150		33450	41421
CD179a	CD179a-2460-B04	33033	40880		33242	41151		33451	41422
CD179a	CD179a-2462-E07	33034	40881		33243	41152		33452	41423
CD22	CD22-HA22	33035	40882		33244	41153		33453	41424
STEAP1	STEAP1-hu120	33036	40883		33245	41154		33454	41425
Liv1	hLiv1-mAb2	33037	40884		33246	41155		33455	41426
Nectina4	hu-Nectina4-mAb1	33038	40885		33247	41156		33456	41427
CRIPTO	hu-Cripto-L1H2	33039	40886		33248	41157		33457	41428
gpA33	hu-gpA33	33040	40887		33249	41158		33458	41429
ROR1	ROR1-DART4	33041	40888		33250	41159		33459	41430

CLL1	CLL1-24C8	33042	40889		33251	41160		33460	41431
CLL1	CLL1-24C1	33043	40890		33252	41161		33461	41432
FLT3	FLT3-10E3	33044	40891		33253	41162		33462	41433
FLT3	FLT3-8B5	33045	40892		33254	41163		33463	41434
IL1RAP	IL1RAP-IAPB57	33046	40893		33255	41164		33464	41435
IL1RAP	IL1RAP-IAPB63	33047	40894		33256	41165		33465	41436
IL1RAP	hu-IL1RAP-	33048	40895		33257	41166		33466	41437
MSLN	MSLN-7D9-v3	33049	40896		33258	41167		33467	41438
MSLN	MSLN-hu22A10	33050	40897		33259	41168		33468	41439
BST1	hu-BST1-A1	33051	40898		33260	41169		33469	41440
BST1	hu-BST1-A2	33052	40899		33261	41170		33470	41441
BST1	hu-BST1-A3	33053	40900		33262	41171		33471	41442
CD19	CAT17	33054	40901		33263	41172		33472	41443
CD22	hu-HA22-1	33055	40902		33264	41173		33473	41444
CD70	CD70-AM13	33056	40903		33265	41174		33474	41445
Her2	Her2-XMT-1520	33057	40904		33266	41175		33475	41446
Her2	Her2-XMT-1518	33058	40905		33267	41176		33476	41447
Her2	huMab4D5-D98W	33059	40906		33268	41177		33477	41448
MSLN	MSLN-3-AM	33060	40907		33269	41178		33478	41449
MSLN	MSLN-5	33061	40908		33270	41179		33479	41450
EGFRviii	EGFRviii-2-AM	33062	40909		33271	41180		33480	41451
EGFRviii	H2M1863N2	33063	40910		33272	41181		33481	41452
DLL3	DLL3-AM6	33064	40911		33273	41182		33482	41453
DLL3	DLL3-AM14	33065	40912		33274	41183		33483	41454
Nectina4	Nectina4-66	33066	40913		33275	41184		33484	41455
MSLN	MSLN-237	33067	40914		33276	41185		33485	41456
MSLN	MSLN-HuAM15	33068	40915		33277	41186		33486	41457
MSLN	MSLN76923	33069	40916		33278	41187		33487	41458
PRLR	PRLR-CN	33070	40917		33279	41188		33488	41459
EMR2	EMR2-USC2-	33071	40918		33280	41189		33489	41460
CEA	CEA-USC14	33072	40919		33281	41190		33490	41461
Her3	Her3-USC14	33073	40920		33282	41191		33491	41462
FOLR1	FOLR1-USC14	33074	40921		33283	41192		33492	41463
FOLR1	FOLR1-USC24	33075	40922		33284	41193		33493	41464
CLDN6	CLDN6-USC1	33076	40923		33285	41194		33494	41465
CLDN6	CLDN6-USC2	33077	40924		33286	41195		33495	41466
SLC34A2	huMX35-LH4	33078	40925		33287	41196		33496	41467
CD22	CD22-INO	33079	40926		33288	41197		33497	41468
CD22	CD22-hu-RFB4	33080	40927		33289	41198		33498	41469
CD22	huHA22-2	33081	40928		33290	41199		33499	41470
CD19	huCD19-USC3	33082	40929		33291	41200		33500	41471
BCMA	BCMA-hu72	33083	40930		33292	41201		33501	41472
MPL	hu-161-3	33084	40931		33293	41202		33502	41473
BAFFR	hu-BAFFR-USC90	33085	40932		33294	41203		33503	41474
BAFFR	hu-BAFFR-USC55	33086	40933		33295	41204		33504	41475
BAFFR	MOR6654	33087	40934		33296	41205		33505	41476
ROR1	ROR1-JJ-67	33088	40935		33297	41206		33506	41477

ROR1	ROR1-JJ-78	33089	40936		33298	41207		33507	41478
ROR1	ROR1-JJ-76	33090	40937		33299	41208		33508	41479
Her2	Her2-FRP5	33091	40938		33300	41209		33509	41480
CD19	CEA-huMN14	33092	40939		33301	41210		33510	41481
CEA	CEA-BW431-26	33093	40940		33302	41211		33511	41482
Her2	hMab4D5-H91A	33094	40941		33303	41212		33512	41483
Her2	Her2-USC-1516	33095	40942		33304	41213		33513	41484
TOSO	TOSO-6B10	33096	40943		33305	41214		33514	41485
CD30	CD30-HRS3	33097	40944		33306	41215		33515	41486
CD229	CD229-USC1-2D4	33098	40945		33307	41216		33516	41487
CD229	CD229-2A2	33099	40946		33308	41217		33517	41488
CD229	CD229-USC3-2D5	33100	40947		33309	41218		33518	41489
CD229	CD229-USC2-2D4	33101	40948		33310	41219		33519	41490
EBV-gp350	EBV-gp350-7A1	33102	40949		33311	41220		33520	41491
EBV-gp350	EBV-gp350-6G4	33103	40950		33312	41221		33521	41492
INFA-A-NA	INFL-NA-1E01	33104	40951		33313	41222		33522	41493
VEB-LMP1	EBV-LMP1EA	33105	40952		33314	41223		33523	41494
PSMA	PSMA-J591-ds75	33106	40953		33315	41224		33524	41495
PSMA	hu-PSMA-J591	33107	40954		33316	41225		33525	41496
PSMA	hu-PSMA-J591	33108	40955		33317	41226		33526	41497
PSMA	PSMA-J591-ds75	33109	40956		33318	41227		33527	41498
MUC1	huMUC1-MNE6	33110	40957		33319	41228		33528	41499
MUC1	MUC1-estrella-MN-E6	33111	40958		33320	41229		33529	41500
MUC1	hu-MUC1-MN-C2	33112	40959		33321	41230		33530	41501
gpA33	hu-gpA33-C825	33113	40960		33322	41231		33531	41502
MSLN	MSLN-7D10	33114	40961		33323	41232		33532	41503
MSLN	MSLN-7D9	33115	40962		33324	41233		33533	41504
MSLN	MSLN-7D9-V29L	33116	40963		33325	41234		33534	41505
MSLN	MSLN-hu22A10	33117	40964		33326	41235		33535	41506
MSLN	hu22A10-N31S	33118	40965		33327	41236		33536	41507
BCMA	hu-USC82-S29G	33120	40966		33329	41237		33538	41508
EGFRviii	GC1-Y31F-USC1	32006	40967		32069	41238		32132	41509
EGFRviii	EGFRviii-GC1	32007	40968		32070	41239		32133	41510
EGFRviii	GC1-S51T-USC2	32008	40969		32071	41240		32134	41511
EGFRviii	GC1-D29N-USC3	32009	40970		32072	41241		32135	41512
EGFRviii	GC2	32010	40971		32073	41242		32136	41513
EGFRviii	GC2-S25R	32011	40972		32074	41243		32137	41514
EGFRviii	GC2-S25N	32012	40973		32075	41244		32138	41515
EGFRviii	GC2-S31N	32013	40974		32076	41245		32139	41516
GD2	GD2-hu3F8-USC1	32014	40975		32077	41246		32140	41517
GD2	GD2-hu3F8-USC2	32015	40976		32078	41247		32141	41518
GD2	hu-KM666-USC1	32016	40977		32079	41248		32142	41519
GD2	GD2-mu-KM666	32017	40978		32080	41249		32143	41520
CLDN18.2	hu-CLD18A2-175D10-USC1	32018	40979		32081	41250		32144	41521
CLDN18.2	hu-CLD18A2-175D10-USC2	32019	40980		32082	41251		32145	41522

CLDN6	hu-CLDN6-BNT-USC1	32020	40981		32083	41252		32146	41523
CLDN6	CLDN6-BNT	32021	40982		32084	41253		32147	41524
CLDN6	CLDN6-BNT-USC1	32022	40983		32085	41254		32148	41525
CLDN6	CLDN6-G51A-AT1	32023	40984		32086	41255		32149	41526
CD19	hu-mROO5-1-A28T-AT1	32024	40985		32087	41256		32150	41527
CD19	hu-mROO5-1-Y32S-AT2	32025	40986		32088	41257		32151	41528
CD19	huCD19-USC3-AT1	32026	40987		32089	41258		32152	41529
CD19	hu-CD19-USC3-AT2	32027	40988		32090	41259		32153	41530
CD79b	huMA79b-AT1	32028	40989		32091	41260		32154	41531
CD79b	huMA79b-AT2	32029	40990		32092	41261		32155	41532
CD79b	huMA79b-AT3	32030	40991		32093	41262		32156	41533
CD79b	huCD79b-AT4	32031	40992		32094	41263		32157	41534
CD79b	huCD79b-AT5	32032	40993		32095	41264		32158	41535
CD79b	huCD79b-AT6	32033	40994		32096	41265		32159	41536
CD79b	huMA79b-AT5	32034	40995		32097	41266		32160	41537
CD79b	huCD79b-2F2-AT1	32035	40996		32098	41267		32161	41538
CD79b	huCD79b-2F2-AT2	32036	40997		32099	41268		32162	41539
CD79b	huCD79b-2F2-AT3	32037	40998		32100	41269		32163	41540
CD79b	huCD79b-2F2-AT4	32038	40999		32101	41270		32164	41541
CD79b	huCD79b-2F2-AT5	32039	41000		32102	41271		32165	41542
CD79b	huCD79b-2F2-AT6	32040	41001		32103	41272		32166	41543
CD79b	huCD79b-2F2-AT7	32041	41002		32104	41273		32167	41544
CD79b	mu-MA79b	32042	41003		32105	41274		32168	41545
TAJ	KN5-USC1-R3D	32043	41004		32106	41275		32169	41546
GPRC5D	Ro-5F11-USC1	32044	41005		32107	41276		32170	41547
GPRC5D	Ro-5E11-USC2	32045	41006		32108	41277		32171	41548
GPRC5D	Ro-5F11-E11-USC	32046	41007		32109	41278		32172	41549
GPRC5D	5E11-5F11-USC	32047	41008		32110	41279		32173	41550
GPRC5D	JJ-5B83-USC3	32048	41009		32111	41280		32174	41551
FCRH5	FCRH5-GN-USC2	32049	41010		32112	41281		32175	41552
FR1	huMov19-USC2	32050	41011		32113	41282		32176	41553
p53-R175H	p53-R175H	32051	41012		32114	41283		32177	41554
p53-R175H	p53-R175H-AT1	32052	41013		32115	41284		32178	41555
p53-R248Q	p53-R248Q-336	32053	41014		32116	41285		32179	41556
Muc16	huMuc16-3A5	32054	41015		32117	41286		32180	41557
ROR1	ROR1-JJ-67	32055	41016		32118	41287		32181	41558
ROR1	ROR1-JJ-67-AT1	32056	41017		32119	41288		32182	41559
DLL3	hSC16-57-USC1	32057	41018		32120	41289		32183	41560
NPM1c	NPM1c-YG1	32058	41019		32121	41290		32184	41561
IL23R	IL23R-SANG-11	32059	41020		32122	41291		32185	41562
HLA-A2	HLA-A2-SANG-76	32060	41021		32123	41292		32186	41563
MOG01	MOG01-USC1	32061	41022		32124	41293		32187	41564

MOG301	Y56N-USC2	32062	41023		32125	41294		32188	41565
MOG	MOG473-USC3	32063	41024		32126	41295		32189	41566
MOG	MOG01	32064	41025		32127	41296		32190	41567
MOG	MOG301	32065	41026		32128	41297		32191	41568
MOG	MOG-AZ17	32066	41027		32129	41298		32192	41569
CSF1R	CSF1R-AXI	32067	41028		32130	41299		32193	41570
CSF1R	CSF1R-AXI-USC1	32068	41029		32131	41300		32194	41571

TABLA 4						
ANTÍGENO DIANA	NOMBRE	Va-SEQ ID NO (DNA)	Va-SEQ ID NO (PRT)	Vb-SEQ ID NO (DNA)	Vb-SEQ ID NO (PRT)	
NY-ESO-1/HLA-A2	IG4	305	8685		322	8702
gp100/HLA-A2	gp100	306	8686		323	8703
Kras/HLA-A11	IMMU	307	8687		324	8704
WT1/HLA-A2	C4	308	8688		325	8705
WT1/HLA-A2	37-45	309	8689		326	8706
MAGE-A4/HLA-A2	A4	310	8690		327	8707
VPH-E6/HLA-A2	E6-5859	311	8691		328	8708
VPH-E6/HLA-A2	E6-5843B14	312	8692		329	8709
VPH-E7/HLA-A2	VPH-E7	313	8693		330	8710
PRAME/HLA-A2	PRAME	32214	40531		32216	40533
PRAME/HLA-A2	PRAME-USC1	32215	40532		32217	40534

TABLA 5

TABLA 5							
ANTÍGE NO DIANA	NOMBRE DEL FRAGMENTO	SEQ ID NO (DNA)	SEQ ID NO (PRT)	ANTÍGE NO DIANA	NOMBRE DEL FRAGMENTO	SEQ ID NO (DNA)	SEQ ID NO (PRT)
MTX	R304-MTX	412	8792	CD30	hu-574-USC1	422	8802
CLDN18-2	C18.2-USC1	413	8793	CD30	hu-542-USC1	423	8803
CLDN18-2	C18.2-USC2	414	8794	CD30	hu-542-USC2	424	8804
CLDN18-2	C18.2-USC3	415	8795	BCMA	BCMA-948	425	8805
CD22	hu-077-USC1	416	8796	BCMA	BCMA-972	426	8806
CD22	hu-077-USC2	417	8797	NYESO1	sVb-TCR	427	8807
DLL3	DLL3-USC1	418	8798	NYESO1	NsVb-TCR	428	8808
DLL3	DLL3-USC4	419	8799	MAGEA3	A3-sVb	429	8809
DLL3	DLL3-USC5	420	8800	MAGEA3	sVb-7-SP	430	8810
DLL3	DLL3-USC3	421	8801	BCMA	hu-E59D-US3	32204	41581
CD20	huCD20-AT1	32195	41572	CD33	hA873-G30S	32205	41582
CD20	huCD20-AT2	32196	41573	CD33	AT264-S30G	32206	41583
BCMA	E59D-USC1	32197	41574	CD33	264-V50A	32207	41584
BCMA	huE59D-AT2	32198	41575	MSLN	AT2-K65R	32208	41585
CD19	hA773-S58T	32199	41576	CD20	hA253-S31N	32209	41586

CD19	AT131-S58T	32200	41577	BCMA	S59Y-x-E59D	32210	41587
CD19	CD19-083	32201	41578	BCMA	E59DxS59Y	32211	41588
CD19	AT83-N29S	32202	41579	BCMA	355-S59Y	32212	41589
CD19	CD19-083	32203	41580	BCMA	BCMA-E59D	32213	41590

TABLA 6

ANTÍGENO DIANA	NOMBRE DEL FRAGMENTO	SEQ ID NO (DNA)	SEQ ID NO (PRT)	ANTÍGENO DIANA	NOMBRE DEL FRAGMENTO	SEQ ID NO (DNA)	SEQ ID NO (PRT)
Her2	DARPIN-1	435	8815	ULBP2R	NKG2D-AF	445	8825
BCMA	BCMA-Centyrina	436	8816	ULBP2-S3	NKG2D-YA	446	8826
Ig-Fc	CD16A-V158-ECD-v1	437	8817	ULBP2R	NKG2D-AF-NKG2D-AF	447	8827
NKG2D-L	CD8SP-NKG2D-GS-NKG2D	438	8818	ULBP2-S3	NKG2D-YA-NKG2D-YA	448	8828
MPL	mTPO(1-187)	439	8819	NKG2D-AF	ULBP2R	449	8829
BCMA	FHVH93-ULBP2R	440	8820	NKG2D-YA	ULBP2-S3	450	8830
Ezip	RZIP	441	8821	K4	E4	443	8823
Rzip	EZIP	442	8822	E4	K4	444	8824

TABLA 7: Complejos péptido/MHC a los que se dirige al SAR (uTCR-SAR)

SEQ ID NO (PRT)	NOMBRE DEL PÉPTIDO	SECUENCIA	MHC/HLA
22780	gp100	IMDQVPFSV	HLA-A*02:01
22781	gp100	YLEPGPVTV	HLA-A*02:01
22782	gp100	KTWGQYWQV	HLA-A*02:01
22783	MUC1-A7(130-138)	NLTISDVSV	HLA-A*02:01
22784	MUC1-D6(13-21)	LLTVLTVV	HLA-A*02:01
22785	TAX(11-19)	LLFGYPVYV	HLA-A*02:01
22786	hTERT(540-548)	ILAKFLHWL	HLA-A*02:01
22787	hTERT(865-873)	RLVDDFLLV	HLA-A*02:01
22788	VIH1gag(77-85)	SLYNTVATL	HLA-A*02:01
22789	CMV-pp65(495-503)	NLVPMVATV	HLA-A*02:01
22790	MART(26-35)	EAAGIGILTV	HLA-A*02:01
22791	EBNA-3A(596-604)	SVRDRLARL	HLA-A*02:01
22792	EBNA-3c	LLDFVRFMGV	HLA-A*02:01
22793	PR1	VLQELNVTV	HLA-A*02:01
22794	Ras9-G12V	LVVVGAVGV	HLA-A*02:01
22795	KRAS-7-16	VVVGADGVGK	HLA-A*11:01
22796	Ras9-G12V	LVVVGAGGV	HLA-A*02:01
22797	NY-ESO-1-(155-163)	QLSLLMWIT	HLA-A*02:01
22798	NY-ESO-1-(157-165)	SLLMWITQC	HLA-A*02:01
22799	NY-ESO-1-(157-167)	SLLMWITQCFL	HLA-A*02:01

22800	Mesotelina	KLLGPHVEGL	HLA-A*02:01
22801	AFP-158	FMNKFIYEI	HLA-A*02:01
22802	MAGE-A3-1271-279	FLWGPRALV	HLA-A*02:01
22803	MAGE-A3- 112-220	KVAELVHFL	HLA-A*02:01
22804	MAGE-A4-230-239	GVYDGREHTV	HLA-A*02:01
22805	WT1-37-45	VLDFAPPGA	HLA-A*02:01
22806	WT1-126-134	RMFPNAPYL	HLA-A*02:01
22807	VPH16-E6-29-38	TIHDIILECV	HLA-A*02:01
22808	VPH16-E7	YMLDLQPET	HLA-A*02:01
22809	EGFR-T790M	IMQLMPFGC	HLA-A*02:01
22810	Human-HA1-H 153-161	VLHDDLLEA	HLA-A*02:01
22811	MyD88-L265P-264-273	RPIPIKYKAM	HLA-B*07:02
22812	EBV-BMLF1-259-267	GLCTLVAM	HLA-A*02:01
22813	EBV-LMP2-426-434	CLGGLLTMV	HLA-A*02:01
22814	Gripe A-M1-58-66	GILGFVFTL	HLA-A*02:01
22815	human-GAD65-114-122	VMNILLQYV	HLA-A*02:01
22816	SARS-CoV-2-S-958-996	ALNTLVKQL	HLA-A*02:01
22817	p53-R248Q-245-254	GMNQRPILTI	HLA-A*02:01
22818	p53-R175H-168-176	HMTEVVRHC	HLA-A*02:01
40581	PRAME	VLDGLDVLL	HLA-A*02:01

TABLA 8: CDR1-3 de cadena ligera y cadena pesada para nuevos dominios de unión a antígeno seleccionados

Objetivo Ag	Nombre de vL/vH/scFv	vL- CDR1	vL- CDR2	vL- CDR3	vH- CDR1	vH- CDR2	vH- CDR3
GD2	GD2-hu3F8-USC1	41807	42078	42349	42620	42891	43162
GD2	hu3F8-USC2	41808	42079	42350	42621	42892	43163
GD2	hu-KM666-USC1	41809	42080	42351	42622	42893	43164
GD2	GD2-mu-KM666	41810	42081	42352	42623	42894	43165
CLDN18.2	huCLD18A2-175D10-USC1	41811	42082	42353	42624	42895	43166
CLDN18.2	huCLD18A2-175D10-USC2	41812	42083	42354	42625	42896	43167
CLDN6	hu-CLDN6-BNT-USC1	41813	42084	42355	42626	42897	43168
CLDN6	CLDN6-BNT	41814	42085	42356	42627	42898	43169
CLDN6	CLDN6-BNT-USC1	41815	42086	42357	42628	42899	43170
CLDN6	CLDN6-G51A-AT1	41816	42087	42358	42629	42900	43171
CD19	hu-mROO5-1-A28T-AT1	41817	42088	42359	42630	42901	43172
CD19	hu-mROO5-1-Y32S-AT2	41818	42089	42360	42631	42902	43173
CD19	hu-CD19-USC3-AT1	41819	42090	42361	42632	42903	43174
CD19	hu-CD19-USC3-AT2	41820	42091	42362	42633	42904	43175
CD79b	huMA79b-AT1	41821	42092	42363	42634	42905	43176
CD79b	huMA79b-AT2	41822	42093	42364	42635	42906	43177
CD79b	huMA79b-AT3	41823	42094	42365	42636	42907	43178

CD79b	huCD79b-AT4	41824	42095	42366	42637	42908	43179
CD79b	huCD79b-AT5	41825	42096	42367	42638	42909	43180
CD79b	huCD79b-AT6	41826	42097	42368	42639	42910	43181
CD79b	huMA79b-AT5	41827	42098	42369	42640	42911	43182
CD79b	Hu-2F2-AT1	41828	42099	42370	42641	42912	43183
CD79b	Hu-2F2-AT2	41829	42100	42371	42642	42913	43184
CD79b	Hu-2F2-AT3	41830	42101	42372	42643	42914	43185
CD79b	Hu-2F2-AT4	41831	42102	42373	42644	42915	43186
CD79b	Hu-2F2-AT5	41832	42103	42374	42645	42916	43187
CD79b	Hu-2F2-AT6	41833	42104	42375	42646	42917	43188
CD79b	Hu-2F2-AT7	41834	42105	42376	42647	42918	43189
CD79b	mu-MA79b	41835	42106	42377	42648	42919	43190
TAJ	KN5-USC1-R3D	41836	42107	42378	42649	42920	43191
GPRC5D	GPRC5D-Ro-5F11-USC1	41837	42108	42379	42650	42921	43192
GPRC5D	GPRC5D-Ro-5E11-USC2	41838	42109	42380	42651	42922	43193
GPRC5D	GPRC5D-Ro-5F11-E11-USC	41839	42110	42381	42652	42923	43194
GPRC5D	GPRC5D-Ro-5E11-5F11-USC	41840	42111	42382	42653	42924	43195
GPRC5D	GPRC5D-JJ-5B83-USC3	41841	42112	42383	42654	42925	43196
FCRH5	FCRH5-GN-USC2	41842	42113	42384	42655	42926	43197
FR1	huMov19-USC2	41843	42114	42385	42656	42927	43198
p53-R175H	p53-R175H	41844	42115	42386	42657	42928	43199
p53-R175H	p53-R175H-AT1	41845	42116	42387	42658	42929	43200
p53-R248Q	R248Q-336-USC1	41846	42117	42388	42659	42930	43201
Muc16	huMuc16-3A5	41847	42118	42389	42660	42931	43202
ROR1	ROR1-JJ-67	41848	42119	42390	42661	42932	43203
ROR1	ROR1-JJ-67-AT1	41849	42120	42391	42662	42933	43204
DLL3	hSC16-57-USC1	41850	42121	42392	42663	42934	43205
NPM1c	NPM1c-YG1	41851	42122	42393	42664	42935	43206
IL23R	IL23R-SANG-11	41852	42123	42394	42665	42936	43207
HLA-A2	HLA-A2-SANG76	41853	42124	42395	42666	42937	43208
MOG01	MOG01-USC1	41854	42125	42396	42667	42938	43209
MOG301	Y56N-USC2	41855	42126	42397	42668	42939	43210
MOG	MOG473-USC3	41856	42127	42398	42669	42940	43211
MOG	MOG01	41857	42128	42399	42670	42941	43212
MOG	MOG301	41858	42129	42400	42671	42942	43213
MOG	MOG-AZ17	41859	42130	42401	42672	42943	43214
CSF1R	CSF1R-AXI	41860	42131	42402	42673	42944	43215
CSF1R	CSF1R-AXI-USC1	41861	42132	42403	42674	42945	43216
CD70	P08F09-USC1	21011	21046	21081	21116	21151	21186
STEAP2	STEAP2-RGN-1162-HL-USC1	21015	21050	21085	21120	21155	21190

[00252] TABLA 9: Ejemplos de enfermedades a las que se dirigen los SAR.

DIANA SAR "X"	EJEMPLOS DE ENFERMEDADES DIRIGIDAS POR SAR (<i>p.ej., SAR CD16, SAR NKp30, SAR NKp44, SAR NKp46 y SAR DAP10, etc.</i>)
CD19	LLa, LLc, linfoma, crisis blástica linfoide de LMC, mieloma múltiple, trastornos inmunitarios, lupus
ALK	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), LACG o neuroblastoma
CD45	Cánceres de la sangre
BCMA	Mieloma, PEL, leucemia de células plasmáticas, Macroglobulinemia de Waldenström, lupus,
CD5	Cáncer de la sangre, leucemia de células T, linfoma de células T
CD20	Cánceres de la sangre, leucemia, LLa, LLc, linfoma, trastornos inmunitarios
CD22	Cánceres de la sangre, leucemia, LLa, LLc, linfoma, crisis blástica linfoide de la LMC, trastornos inmunitarios
CD23	Cánceres de la sangre, leucemia, LLa, LLc, linfoma, trastornos autoinmunitarios (lupus)
CD30	Linfoma de Hodgkins, linfoma cutáneo de células T
CD32	Tumores sólidos
CD33 o CD34	Cánceres de la sangre, LMA, SMD
CD70	Cánceres de la sangre, Macroglobulinemia de Waldenström, Cáncer de riñón
CD79b	Cánceres de la sangre, LLa, Linfoma, trastorno autoinmunitario (lupus)
CD123	Cánceres de la sangre, LMA, SMD
CD138	Cánceres de la sangre, mieloma, PEL, leucemia de células plasmáticas, Macroglobulinemia de Waldenström
CD179b	Cánceres de la sangre, LLa, Linfoma
CD276/B7-H3	Sarcoma de Ewing, neuroblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de ovario
CD324	Tumores sólidos, cáncer de esófago, próstata, colorrectal, mama, pulmón
CDH6	Tumores sólidos, renales, de ovario, de tiroides
CDH17	Adenocarcinomas gastrointestinales, de pulmón, de ovario y de endometrio
CDH19	Tumor sólido, Melanoma
EGFR	Cáncer de colon, cáncer de pulmón
CLEC5A	Cánceres de la sangre, leucemia, leucemia mieloide aguda
GR/LHR	Cáncer de próstata, cáncer de ovario o cáncer de mama
CLL1	Cáncer de la sangre, Leucemia
CS1	Cánceres de la sangre, mieloma, PEL, leucemia de células plasmáticas
CSF2RA	LMA, CML, SMD
CD123	Cánceres de la sangre, LMA, SMD
DLL3	Melanoma, cáncer de pulmón o cáncer de ovario
EGFR	Tumores sólidos, cáncer de colon, cáncer de pulmón
EGFRvIII	Tumores sólidos, glioblastoma
EpCam1	Cáncer gastrointestinal
FLT3	Cánceres de la sangre, LMA, SMD, TODOS

DIANA SAR "X"	EJEMPLOS DE ENFERMEDADES DIRIGIDAS POR SAR (p.ej., SAR CD16, SAR NKp30, SAR NKp44, SAR NKp46 y SAR DAP10, etc.)
Receptor de folato alfa	Cáncer de ovario, NSCLC, cáncer de endometrio, cáncer renal u otros tumores sólidos
FSHR	Cáncer de próstata, cáncer de ovario o cáncer de mama
GD2	Neuroblastoma
GD3	Melanoma
GFRa4	Cáncer, cáncer medular de tiroides
Fucosil-GM1(GM1)	Cáncer de pulmón de células pequeñas
GPRC5D	Mieloma, PEL, leucemia de células plasmáticas, Macroglobulinemia de Waldenström, trastorno autoinmunitario (lupus)
gp100	Melanoma
GPC3	Tumores sólidos, Cáncer de pulmón
gpNMB	Melanoma, tumores cerebrales, cánceres gástricos
GRP78	Mieloma
Her2	Tumores sólidos, cáncer de mama, cáncer de estómago
Her3	Colorrectal, cáncer de mama
IL11Ra	Cánceres de la sangre, LMA, LLa, LMC, SMD, sarcomas
IL6Ra	Tumores sólidos, Cáncer de hígado
IL13Ra2	Glioblastomas
LAMP1	Cánceres de la sangre, LMA, LLa, SMD, LLc, CML
LewisY	Cánceres
L1CAM	Tumores sólidos, cáncer de ovario, de mama, de endometrio, melanoma
LHR	Cáncer de próstata, cáncer de ovario o cáncer de mama
Lym1	Cáncer de la sangre, Leucemia, Linfoma
Lym2	Cáncer de la sangre, Leucemia, Linfoma
MART1/MHC I	Melanoma
Mesotelina	Mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas
Muc1/MHC I	Cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón
Muc16	Cáncer de ovario
NKG2D	Leucemia, linfoma o mieloma
NYBR1	Cáncer de mama
PSCA	Cáncer de próstata
PR1/MHC I	Cáncer de la sangre, Leucemia
Receptor de prolactina	Cáncer de mama, cáncer cromóforo de células renales
PSMA	Cáncer de próstata
PTK7	Melanoma, cáncer de pulmón o cáncer de ovario
ROR1	Cáncer de la sangre, neoplasia maligna de células B, linfoma, LLc
SLea	Cáncer de páncreas, cáncer de colon
SSEA4	Cáncer de páncreas
Tirosinasa	Melanoma
TCRB1	Leucemias y linfomas de células T, trastornos autoinmunitarios
TCRB2	Leucemias y linfomas de células T, trastornos autoinmunitarios

DIANA SAR "X"	EJEMPLOS DE ENFERMEDADES DIRIGIDAS POR SAR (p.ej., SAR CD16, SAR NKp30, SAR NKp44, SAR NKp46 y SAR DAP10, etc.)
TCRgd	Leucemias y linfomas de células T, trastornos autoinmunitarios
hTERT	Tumores sólidos, cánceres de la sangre
TGFB2	Tumores sólidos queloides
TIM1/HAVER1	Cáncer de riñón, cáncer de hígado
TROP2	Tumores sólidos, Cáncer de mama, Cáncer de próstata
TSHR	Cáncer de tiroides, leucemia de células T, linfoma de células T
TSLPR	Cánceres de la sangre, leucemias, LMA, SMD
WT1/MHC I	Cánceres de la sangre, LMA
Receptor de folato β	LMA, Mieloma
B7H4	Cáncer de mama o cáncer de ovario
CCG	Cáncer gastrointestinal
CD200R	Cánceres de la sangre, LMA, SMD
AFP/MHC I	Tumores sólidos, Cáncer de hígado
CD99	Cáncer de hígado
GPRC5D	Mieloma, Macroglobulinemia de Waldenström
HPV16-E7/MHC I	Cánceres asociados al VPH16, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello
Tn-Muc1	Tumores sólidos y cánceres de la sangre
Cadena Igk-Light	Mieloma, leucemia de células plasmáticas
CLD18A2 (Claudina 18.2)	Cáncer gástrico, de páncreas, de esófago, de ovario o de pulmón
CD43	Cánceres de la sangre, LMA
NY-ESO-1/MHC I	Mieloma
MPL/TPO-R	Cáncer de la sangre, LMA, SMD, CML, LLa, Trastornos mieloproliferativos, Policitemia vera, Mielofibrosis, Policitemia esencial
STEAP1	Cáncer gástrico, de próstata o linfoma
Liv1 (SLC39A6)	Cáncer de mama o de próstata
Nectina4 (PVRL4)	Cáncer de vejiga, renal, cervical, de pulmón, cabeza y cuello o de mama
Cripto (TDGF1)	Cáncer colorrectal, de endometrio o de ovario
gpA33	Cáncer colorrectal, de endometrio o de ovario
FLT3	Cánceres de la sangre, LMA, LLa, SMD
BST1/CD157	Cánceres de la sangre, LMA, SMD
IL1RAP	Cáncer de hígado, colorrectal, de cuello uterino, de pulmón o de ovario
Canal de cloruro	Glioma
IgE	Alergia
HLA-A2	Enfermedad de injerto contra huésped, rechazo tisular (SIR expresado en células T reguladoras)
Amiloide	Amiloidosis, enfermedad de Alzheimer
VIH1-env	VIH/SIDA y afecciones relacionadas

DIANA SAR "X"	EJEMPLOS DE ENFERMEDADES DIRIGIDAS POR SAR (p.ej., SAR CD16, SAR NKp30, SAR NKp44, SAR NKp46 y SAR DAP10, etc.)
CLDN6	Cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer gastrointestinal
STEAP2	Cáncer de próstata

TABLA 9B

NOMBRE DEL FRAGMENTO	SEQ ID ADN	SEQ ID PRT	NOMBRE DEL FRAGMENTO	SEQ ID ADN	SEQ ID PRT
Péptido conector de TCRa-MD	615	8995	TCRa-TM	625	9005
Péptido conector del TCRa	616	8996	TCRb-TM	626	9006
Péptido conector de TCRb-MD	617	8997	TCRg-TM	627	9007
Péptido conector de TCRb	618	8998	TCRd-TM	628	9008
TCRg-Connecting-Peptide-MD	619	8999	CD3z-TM	629	9009
Péptido conector del TCRg	620	9000	TCRa-CP	631	9011
TCRd-Péptido conector-MD	621	9001	TCRb-CP	632	9012
TCRd-Péptido conector	622	9002	TCRg-CP	633	9013
Péptido conector CD3z (bisagra)	623	9003	CD3z-CP	634	9014
CD16A-F158V-Bisagra-v1	862	9242	CD8b-CP	647	9027
CD16A-F158V-TM-v1	764	9144	CD8a-CP	648	9028
CD16A-F158V-cP-v1	765	9145	CD4-CP	649	9029
CD8-Hinge-opt1	748	9128	CD28-CP	502	8882
CD3zECDTMCP-opt	500	8880	41BB-CP	503	8883
CD3zECDTMCP-opt2	507	8887	FcRy-CP-opt1	877	9257
hTCR-alfa-constante	453	8836	hTCR-b1-constante	467	8847
hTCRa-WT	454	8838	hTCR-b2-constante	468	8848
hTCRa-opt2	456	8835	hTCRb-WT	469	8849
hTCRa-T48C-opt	458	8835	hTCRb-S57C-opt1	470	8850
hTCRa-CSDVP	455	8833	hTCRb-KACIAH	471	8851
hTCRa-Med12	32218	40535	hTCRb-opt2	472	8852
TCRa-MED17	32219	40536	TCRb-opt-Med13	40537	32220
mTCRa-opt	465	8845	mTCRb-opt	486	8866
hTCR-gamma	492	8872	hTCR-Delta	494	8874
hTCR-Gamma-Opt	493	8873	hTCR-Delta-Opt	495	8875
mTCRg	32222	40539	hTCR-Delta	494	8869
mTCRd	32221	40538			

En el documento PCT/2020/014237 se ofrecen ejemplos de enfermedades a las que se dirigen las SAR dirigidas a diferentes antígenos.

[00253] La solicitud de patente PCT/US22/17177 describe un nuevo diseño de SAR denominado TCR-SAR universal (o uTCR-SAR), que confiere al receptor de células T una especificidad de unión a antígeno similar a la de cualquier célula. En una realización, un uTCR-SAR comprende: a) una primera cadena polipeptídica que comprende un primer dominio de unión a antígeno y un primer módulo asociado a membrana (MAM); y b) una segunda cadena polipeptídica que comprende un segundo dominio de unión a antígeno y un segundo módulo asociado a membrana (MAM), en el que el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno forman un antígeno de unión a antígeno similar a TCR (*p.ej.*, TCR-Fv) que se une específicamente al antígeno diana, y en el que el primer MAM y el segundo MAM forman un módulo receptor de células no T (NTCRM). En algunas realizaciones, el primer y el segundo MAM de un uTCR-SAR comprenden un dominio transmembrana o asociado a membrana de un adaptador de señalización. En una realización, el adaptador de señalización se selecciona de, pero no se limita a, uno o más de CD3 ζ , FcR γ , DAP10 y/o DAP12 o variantes o fragmentos de los mismos. En una realización, la MAM de un uTCR-SAR comprende un receptor no-TCR (*p.ej.*, CD16).

[00254] La presente divulgación proporciona una uTCR-SAR que comprende la secuencia de aminoácidos de referencia de la cadena V α (o Va o a) del SEQ ID NO: 8685-8693, 40531-32 o una variante de la misma y la secuencia de aminoácidos de referencia de la cadena V β (o Vb o b) del SEQ ID NO: 8702-8710, 40533-34 una variante de la misma, donde la uTCR-SAR se dirige a un antígeno que se muestra en las **Tablas 4 y 7**. Los SEQ ID NO de los antígenos peptídicos de ejemplo enumerados en la **Tabla 4** se proporcionan en la **Tabla 7**. Una variante puede tener una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia (*p.ej.*, con respecto a la secuencia de referencia de cadena a y/o la secuencia de referencia de cadena b). La uTCR-SAR puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de referencia de cadena α (o a) de SEQ ID NO: 305-313 o una variante de la misma y la secuencia de nucleótidos de referencia de cadena β (o b) de SEQ ID NO: 322-330 o una variante de la misma. Una variante puede tener una secuencia de nucleótidos que tenga al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de referencia (*p.ej.*, con respecto a la secuencia de referencia de cadena a y/o a la secuencia de referencia de cadena b).

[00255] Según la invención, la uTCR-SAR puede ser una NY-ESO-1 uTCR-SAR que puede comprender la secuencia de aminoácidos de referencia de la cadena V α (o Va o a) de SEQ ID NO: 8685 o una variante de la misma y la secuencia de aminoácidos de referencia de la cadena

Vβ (o Vb o b) de SEQ NO: 8702 o una variante de la misma. La NY-ESO-1 uTCR-SAR puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de referencia de la cadena α (o a) de la SEQ ID NO: 305 o una variante de la misma y la secuencia de nucleótidos de referencia de la cadena b de la SEQ ID NO: 322 o una variante de la misma. En una realización, el NY-ESO-1 uTCR-SAR se une a un antígeno peptídico (-SLLMWITQC- o -SLLMWITQCFL-) representado por SEQ ID NO: 22798-99, opcionalmente en complejo con HLA-A*02:01. Los ejemplos de uTCR-SAR dirigidos al péptido NY-ESO-1 (SLLMWITQC o SLLMWITQCFL) y que comprenden diferentes cadenas de señalización se presentan en SEQ ID NO:10621-10697 (**Tablas 11 y 12** de la solicitud de patente provisional). Además, las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de uTCR-SAR dirigidas al péptido NY-ESO-1 en las que una o ambas cadenas de señalización CD3z (*p.ej.*, CD3zECDTMCP; *p.ej.*, SEQ ID NO: 8880) se sustituyen por una cadena de señalización CD3z que comprende la supresión del residuo 101 (es decir, CD3zECDTMCP-dQ101; SEQ ID NO:9327) se presentan en SEQ ID NO: 11567-11623 (**Tabla 13**). Como las uTCR-SAR tienen un formato modular, las cadenas de señalización pueden sustituirse por cadenas de señalización diferentes (*p.ej.*, SEQ ID NO:9327-9340) o variantes funcionales de las mismas para generar nuevas uTCR-SAR con propiedades distintas. Del mismo modo, los dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, Vα, Vβ, Vγ, Vδ, vL, vH, vHH, svTCR, etc.) y los dominios enlazadores de las construcciones uTCR-SAR de ejemplo pueden sustituirse por dominios de unión a antígeno dirigidos a antígenos diferentes (*p.ej.*, MAGE-A3, MAGE-A4, etc.) o enlazadores diferentes (*p.ej.*, Ig o enlazadores similares a Ig) o variantes funcionales de los mismos para generar nuevas uTCR-SAR con propiedades distintas.

[00256] La divulgación proporciona uTCR-SAR dirigidos a MAGE-A4, WT-1, gp100, KRas, HPV-E6, HPV-E7 y PRAME. Los fragmentos Va y Vb dirigidos a estos antígenos se proporcionan en la **Tabla 4**. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de ejemplos de uTCR-SAR dirigidos a diferentes antígenos peptídicos y que comprenden diferentes cadenas de señalización se presentan en las **Tablas 11, 12 y 13** de la solicitud de patente provisional.

[00257] La solicitud de patente PCT/US22/17177 (incorporada en su totalidad por referencia en el presente documento) describe SARs de cadena simple y doble basados en isoformas de CD16 (CD16a y CD16b). La presente invención describe SAR basados en CD16 que comprenden cadenas CD16 mutantes. En una realización, las cadenas CD16 mutantes del CD16-SAR de la presente divulgación comprenden delección en el dominio citoplasmático CD16. En una realización, las cadenas CD16 mutantes de la CD16-SAR de la presente divulgación carecen del dominio citoplasmático CD16. En una realización, las cadenas CD16 mutantes del CD16-SAR de la presente divulgación comprenden mutación en el dominio transmembrana CD16. En

una realización, las cadenas CD16 mutantes del CD16-SAR de la presente divulgación carecen del CD16 de longitud completa.

[00258] Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de péptido conector, bisagra, transmembrana (TM), dominios citoplasmáticos (CP) de las cadenas CD16, CD3z, FcRy y coreceptores y receptores coestimuladores que pueden utilizarse en la construcción de un SAR se proporcionan en la **Tabla 9B**. Los números SEQ ID de diferentes enlazadores de Ig y dominios constantes de TCR se proporcionan en la solicitud de patente provisional. Los ejemplos de cadenas CD16 con dominios citoplasmáticos suprimidos y mutados que pueden usarse en la construcción de un SAR se proporcionan en SEQ ID NO (PRT): 8945-8948. En una realización, el SAR puede construirse utilizando cadenas CD16 con al menos un 70% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8945-8948 o variantes funcionales de las mismas. Ejemplos de SAR con dominios citoplasmáticos suprimidos y mutados se presentan en SEQ ID NO (DNA): 1111-2234 y SEQ ID NO (PRT): 9491-10614 (véanse también las **Tablas 9-10** de la solicitud de patente provisional). En una realización, el SAR puede construirse en el que uno o más dominios de unión a antígeno se unen al N-terminal o cerca del N-terminal del dominio extracelular completo o parcial de las cadenas CD16 representadas por SEQ ID NO (PRT): 8945-8948 o variantes funcionales de las mismas.

[00259] La divulgación proporciona SARs hetero-diméricos de cadena simple, cadena doble y cadena doble que comprenden la región parcial o completa de CD16 (FcγRIII). La divulgación proporciona SAR que comprenden CD16 o fragmentos de los mismos que tienen al menos un 70% de identidad con cualquiera de las secuencias de CD16 descritas en el presente documento (SEQ ID NO: 8945-8948) conservando la actividad biológica. Las secuencias mutantes de ácido nucleico y aminoácido de CD16 de ejemplo que pueden usarse en la construcción de CD16-SARs de la divulgación se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 565-568 y SEQ ID NO (PRT): 8945-8948 o residuos equivalentes (es decir, un homólogo) de una especie no humana, *p.ej.*, ratón, roedor, mono, simio y similares.

[00260] En algunas realizaciones, las secuencias de CD16 que pueden utilizarse en la construcción de los CD16-SARs de la divulgación pueden incluir mutantes y variantes que aumentan la afinidad de CD16 por la región Fc de la inmunoglobulina (*p. ej.*, CD16A-F158V) y, además, evitan su escisión de la superficie celular (*p. ej.*, CD16A-F158V-S197P).

[00261] En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de la molécula de SAR comprende la secuencia de ácido nucleico de CD16 humana que se muestra en SEQ ID NO: 565-568. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de la molécula SAR comprende la secuencia que codifica para la secuencia de aminoácidos de CD16 que tiene al menos una, cinco o diez modificaciones, pero no más de 20 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 8945-8948, o una secuencia con homología del 70-99% a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8945-8948. En ciertas realizaciones, la molécula SAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8945-8948 o residuos equivalentes de una especie no humana.

[00262] En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR de cadena simple que comprende la región parcial o completa de CD16 o una variante de la misma. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR de cadena única que comprende una región parcial o completa del dominio extracelular de CD16. Secuencias de dominio extracelular de CD16 de ejemplo que pueden usarse en la construcción de un CD16-SAR de la divulgación se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 759-761 y SEQ ID NO (PRT): 9139-9141 o los residuos equivalentes (es decir, un homólogo) de una especie no humana. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR que comprende la región parcial o completa del dominio bisagra de CD16. Las secuencias de dominio bisagra de CD16 de ejemplo que pueden usarse en la construcción de un CD16-SAR de la divulgación se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 763 y SEQ ID NO (PRT): 9143 o los residuos equivalentes (es decir, un homólogo) de una especie no humana. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR que comprende la región parcial o completa del dominio transmembrana de CD16. Secuencias transmembrana de CD16 de ejemplo que pueden usarse en la construcción de CD16-SARs de la divulgación se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 764 y SEQ ID NO (PRT): 9144 o los residuos equivalentes (es decir, un homólogo) de una especie no humana. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR que comprende una región parcial o completa del dominio citosólico de CD16. La divulgación también proporciona SAR que comprenden variantes de CD16 o fragmentos de las mismas que retienen al menos una actividad biológica del CD16 de tipo salvaje con el que tiene identidad u homología.

[00263] En una realización, el CD16-SAR comprende el dominio extracelular CD16 que comprende ambos dominios similares a inmunoglobulina (es decir, D1 y D2) que está unido a través del dominio bisagra CD16 al dominio transmembrana CD16. En una realización, el dominio transmembrana CD16 comprende una mutación. En una realización, el dominio transmembrana CD16 comprende una mutación S213Y. Un ejemplo de tal CD16-SAR dirigida a CD19 está representado por CD8SP-CD19-hu-mROO5-1-(vL-vH)-CD16A-F158V-S197P-v3-L639-S213Y (SEQ ID NO(DNA): 2057 y SEQ ID NO (PRT): 10437. En SEQ ID NO (DNA): 2057 y SEQ ID NO (PRT): 10437 se proporcionan ejemplos adicionales de SAR que comprenden scFv, FHVH, vHH y andamiajes de unión a antígeno no inmunoglobulina dirigidos a diferentes antígenos: 1954-2234 y SEQ ID NO PRT): 10334-10614. Un CD16-SAR de este tipo también conserva la capacidad de unirse a la región Fc de un anticuerpo, un fragmento de

anticuerpo o un captador biespecífico/triespecífico y mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Por lo tanto, las células inmunitarias (*p.ej.*, células T, células NK, monocitos/macrófagos, neutrófilos, etc.) que expresan el SAR CD8SP-CD19-hu-mROO5-1-(vL-vH)-CD16A-F158V-S197P-v3-L639-S213Y pueden dirigirse a células diana que expresan CD19 a través de la región scFv CD19-hu-mROO5-1. Además, dichas células inmunitarias pueden tener la capacidad de unirse a un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un captador biespecífico/triespecífico y mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Además, dichas células inmunitarias pueden redirigirse a las células diana que expresan Her2 en presencia de Herceptin. Alternativamente, dichas células inmunitarias (*p.ej.*, células T o NK) pueden redirigirse a células diana que expresen CD20 en presencia de rituximab.

[00264] En una realización, el CD16-SAR comprende el dominio extracelular CD16 que comprende ambos dominios similares a inmunoglobulina (es decir, D1 y D2) que está unido a través del dominio bisagra CD16 al dominio transmembrana CD16, pero carece de un dominio citosólico CD16 completo. Un ejemplo de tal SAR está representado por CD8SP-CD19-hu-mROO5-1-(vL-vH)-CD16A-F158V-S197P-v3-L639 (SEQ ID NO (DNA): 1495 y SEQ ID NO (PRT): 9875. En SEQ ID NO (DNA): 1111-1953 y SEQ ID NO (PRT): 9875 se proporcionan ejemplos adicionales de SAR basados en CD16 dirigidos a diferentes antígenos: 1111-1953 y SEQ ID NO (PRT): 9491-10333. Dichos SAR basados en CD16 también conservan la capacidad de unirse a la región Fc de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un captador biespecífico/triespecífico y mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Así, las células inmunitarias (*p.ej.*, células T, células NK, monocitos/macrófagos, neutrófilos, etc.) que expresan un SAR de este tipo pueden dirigirse a las células a través de sus dominios de unión a antígeno exógeno (*p.ej.*, scFv, vHH, FHVH, etc.). Además, dichas células inmunitarias pueden redirigirse a las células diana que expresan Her2 en presencia de Herceptin. Alternativamente, dichas células inmunitarias (*p.ej.*, células T o NK) pueden redirigirse a células diana específicas que expresen CD20 en presencia de rituximab.

[00265] En una realización, el CD16-SAR comprende el dominio bisagra CD16 parcial o completo que está unido al dominio transmembrana CD16. El dominio transmembrana CD16 puede comprender una mutación (*p.ej.*, S213Y). Tal CD16-SAR carece de la capacidad de unirse a un anticuerpo ya que carece de los dominios D1 y D2. En una realización, el SAR basado en CD16 comprende un dominio bisagra (espaciador) heterólogo que está presente entre el dominio de unión a antígeno (*p.ej.*, scFv, o AABD) y el dominio bisagra de CD16.

[00266] En una realización, el CD16-SAR comprende un AABD (*p. ej.*, un vHH, FHVH, chVH, centyrina, afibodina, etc.) que se inserta entre el dominio D2 y el dominio bisagra de CD16 con enlazadores intermedios opcionales (*p. ej.*, enlazador Gly4-Ser). En una realización

de ejemplo, los diferentes dominios de tal CD16-SAR desde amino a carboxi-terminal incluyen un péptido de señal N-terminal, dominio CD16-D1, dominio CD16-D2, enlazador opcional, AABD (*p. ej.*, vHH, FHVH, centyrina, afibodina, etc.), enlazador opcional, dominio bisagra CD16 y dominio transmembrana CD16.

[00267] Debe entenderse que los diferentes dominios CD16 (es decir, extracelular, D1, D2, bisagra y transmembrana) que pueden utilizarse en la construcción del SAR pueden comprender su secuencia completa o un mutante de delección o una variante siempre que el dominio conserve al menos una de sus propiedades funcionales. Los dominios CD16 pueden comprender su secuencia de tipo salvaje o una o más de las variantes de alta afinidad (*p. ej.*, F158V) o de alta afinidad no eliminable (*p. ej.*, F158V/S197P o F158V/S197R).

[00268] En una realización, el dominio de unión a antígeno del CD16-SAR comprende un scFv, un vL, vH, Fv, Va, Vb, Vg, Vd, TCR-Fv, vHH, FHVH, un anticuerpo de dominio único, un TCR de cadena única (scTCR), un TCR de dominio variable único (svd-TCR), un andamiaje de unión a antígeno no inmunoglobulina, un ligando (*p. ej.*, APRIL) o el dominio extracelular de un receptor (*p. ej.*, PD1, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, etc.). La cadena de un SAR de cadena única puede unirse a un antígeno o a más de un antígeno (*p. ej.*, dos, tres, cuatro, etc.). La cadena de un CD16-SAR de cadena única puede comprender además uno o más adaptadores (*p. ej.*, RZIP, EZIP, NKG2D-YA, etc.).

[00269] En algunas realizaciones, el CD16-SAR de la divulgación comprende una molécula de la fórmula general:

AABD(*n*)-dominio D1 CD16 opcional-dominio enlazador CD16 opcional-dominio D2 CD16 opcional, dominio bisagra CD16-dominio transmembrana CD16. En una realización, *n* es al menos 2, *p. ej.* 2, 3, 4 o 5. El AABD (dominio autónomo de unión a antígeno) forma el dominio de unión a antígeno y se localiza en el lado extracelular cuando se expresa en una célula.

[00270] En algunas realizaciones, el CD16-SAR de la divulgación comprende una molécula de la fórmula general:

scFv(*n*)-dominio CD16 D1 opcional - dominio enlazador CD16 -opcional-dominio CD16 D2, dominio bisagra CD16 -dominio CD16 transmembrana, donde *n* es 1 o más.

[00271] Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de SAR que comprenden el mutante CD16A-F158V-S197P-v3-L642 en fusión con los diferentes dominios de unión a antígeno dirigidos a diferentes antígenos se presentan en la **Tabla 9** de la solicitud de patente provisional. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de SAR que comprenden los otros mutantes CD16 en fusión con los diferentes dominios de unión a antígeno dirigidos a diferentes antígenos se presentan en la **Tabla 10** de la solicitud de patente provisional. En una realización, un

ejemplo de SAR comprende la secuencia de cadena mutante de CD16 y comprende un fragmento vHH o un fragmento FHVH unido a un scFv dirigido a CD19. También se proporcionan SARs de ejemplo que comprenden la secuencia de cadena mutante CD16 y comprenden un adaptador (SEQ ID NO: 1381-87) o un scTCR.

[00272] Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de SAR de ejemplo que comprenden el CD16A mutante en fusión con fragmentos vHH y FHVH dirigidos a diferentes antígenos están representadas por SEQ ID NO (DNA):1300-1368 y SEQ ID NO (PRT): 9680-9748, respectivamente.

[00273] Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de SAR de ejemplo que comprenden el CD16A mutante en fusión con dominios de unión a antígeno no inmunoglobulina (*p. ej.*, DARPIN, centyrina, afibodina), dominios extracelulares de receptor (*p. ej.*, NKG2D), ligandos/citoquinas (*p. ej.*, TPO), adaptadores (*p. ej.*, EZIP, K4, ULBP2R y ULBP2-S3, etc.) dirigidos a diferentes antígenos están representados en la **Tabla 9** de la solicitud de patente provisional por SEQ ID NO (DNA):1369-1387 y SEQ ID NO (PRT): 9747-9767, respectivamente.

[00274] Las células T que expresan un SAR basado en CD16 de cadena simple con cadena CD16 mutante cuando se exponen a una célula que expresa el antígeno diana cognado pueden activar la señalización NFAT, inducir la producción de IL2, promover la proliferación de células T, promover la activación de células T y ejercer citotoxicidad. En otro ejemplo de realización, las células NK que expresan un CD16-SAR de cadena única con cadena CD16 mutante cuando se exponen a una célula que expresa el antígeno diana afín pueden inducir la producción de IL2, promover la proliferación de células NK, promover la activación de células NK o ejercer citotoxicidad. En otro ejemplo de realización, los monocitos/macrófagos que expresan un CD16-SAR de cadena única con cadena CD16 mutante cuando se exponen a una célula que expresa el antígeno diana afín pueden inducir la fagocitosis de las células diana. En otra realización de ejemplo, los granulocitos (*p. ej.*, neutrófilos) que expresan una cadena única CD16-SAR con cadena CD16 mutante cuando se exponen a una célula que expresa el antígeno diana afín pueden inducir la fagocitosis de las células diana.

[00275] En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona una plataforma novedosa de receptores de antígeno sintéticos, designados CD16-SARs, que contienen dos cadenas en las que al menos una cadena comprende la secuencia parcial o completa de una cadena CD16 mutante o una variante de la misma. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona una plataforma novedosa de receptores de antígeno sintéticos, designados CD16-SAR, que contienen dos cadenas en las que al menos una cadena comprende el dominio bisagra CD16 y el dominio transmembrana CD16, pero carece de un dominio citosólico. En ciertas realizaciones, la

divulgación proporciona una plataforma novedosa de receptores de antígeno sintéticos, designados CD16-SAR, que contienen dos cadenas en las que al menos una cadena comprende un dominio transmembrana CD16, pero carece de un dominio citosólico. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona una plataforma novedosa de receptores de antígeno sintéticos, designados CD16-SAR, que contienen dos cadenas en las que al menos una cadena comprende un dominio transmembrana CD16 con una o más mutaciones, pero carece de un dominio citosólico. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona una plataforma novedosa de receptores de antígeno sintéticos, designados CD16-SAR, que contienen dos cadenas en las que al menos una cadena comprende una bisagra CD16 y un dominio transmembrana, pero carece de un dominio citosólico. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona una plataforma novedosa de receptores de antígeno sintéticos, designados CD16-SAR, que contienen dos cadenas en las que al menos una cadena comprende un dominio bisagra CD16 y un dominio transmembrana CD16 con una o más mutaciones, pero carece de un dominio citosólico. Ejemplos de CD16-SAR de doble cadena se presentan en SEQ ID NO (DNA): 1388-1391 y SEQ ID NO (PRT): 9768-9771. Las secuencias de SAR de doble cadena CD16 de ejemplo adicionales se presentan en la **Tabla 10** de la solicitud de patente provisional.

[00276] En una realización, la divulgación proporciona un SAR basado en CD16 de doble cadena en el que al menos una cadena comprende una región parcial o completa del dominio extracelular CD16 y comprende el dominio transmembrana CD16 con una mutación (*p.ej.*, mutación S213Y). En una realización, la divulgación proporciona un SAR basado en CD16 de doble cadena en el que al menos una cadena comprende una región parcial o completa del dominio extracelular CD16 y comprende el dominio transmembrana CD16, pero carece de un dominio citoplasmático. En las secciones precedentes se proporcionan ejemplos de secuencias de dominio extracelular CD16, dominio bisagra y dominio transmembrana que pueden utilizarse en la construcción de CD16-SARs de doble cadena de la divulgación.

[00277] La divulgación proporciona un SAR basado en CD16 de doble cadena en el que el fragmento vL o vH de un anticuerpo se une funcionalmente a una primera cadena que comprende un dominio transmembrana CD16 y el fragmento vH o vL complementario puede unirse a una segunda cadena que comprende un dominio transmembrana de un adaptador de señalización (*p.ej.*, CD3z, FcRy, DAP10, DAP12, etc.). Cuando las dos cadenas de este tipo (*p.ej.*, vL- CD16 y vH- CD3zECDTMCP o vL-CD16 y vH-FcRy1) se coexpresan en la misma célula, los fragmentos vL y vH pueden unirse a su antígeno afín y transmitir una señal celular. Cabe señalar que los fragmentos vL y vH de un SAR de este tipo no son capaces de unirse al antígeno por sí solos en ausencia del fragmento complementario. Cabe señalar que la unión al

antígeno de un SAR basado en CD16 descrito puede comprender dominios variables derivados de un TCR (*p.ej.*, $V\alpha$, $V\beta$, $V\gamma$ o $V\delta$) en lugar de los fragmentos vL y vH de un anticuerpo.

[00278] En una realización, la cadena CD16 puede ser una cadena mutante (*p.ej.*, compuesta por la mutación S213Y). En una realización, la cadena CD16 puede carecer de un dominio citoplasmático o contener un dominio citoplasmático parcial. En una realización, la cadena CD16 puede contener un dominio citoplasmático parcial que comprende no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15 o 20 residuos de aminoácidos. En una realización de ejemplo, las células T que expresan dicha CD16-SAR cuando se exponen a una célula que expresa el antígeno diana afín pueden activar la señalización NFAT, inducir la producción de IL2, promover la proliferación de células T, promover la activación de células T y ejercer citotoxicidad. En otra realización de ejemplo, las células NK que expresan dicho CD16-SAR cuando se exponen a una célula que expresa el antígeno diana afín pueden inducir la producción de IL2, promover la proliferación de células NK, promover la activación de células NK o ejercer citotoxicidad. En otra realización de ejemplo, los monocitos/macrófagos que expresan dicho CD16-SAR cuando se exponen a una célula que expresa el antígeno diana afín pueden inducir la fagocitosis de las células diana. En otra realización de ejemplo, los monocitos/macrófagos que expresan un CD16-SAR de doble cadena cuando se exponen a una célula que expresa el antígeno diana afín pueden inducir la fagocitosis de las células diana. En otro ejemplo de realización, los granulocitos que expresan una doble cadena CD16-SAR cuando se exponen a una célula que expresa el antígeno diana afín pueden inducir la fagocitosis de las células diana.

[00279] La expresión y actividad del SAR de doble cadena (*p.ej.*, CD16-SAR, zSIR, uTCR-CAR, zSAR, Fc ϵ R γ 1-SAR, etc.) puede aumentarse aún más mediante la incorporación de un enlazador entre los dominios vL/vH, V/ $V\alpha\beta$ o V/ $V\gamma\delta$ y los adaptadores de señalización (*p.ej.*, CD3z, Fc ϵ R γ 1, etc.) y/o la cadena de señalización (*p.ej.*, CD16). En particular, los dominios IgCL (SEQ ID NO: 8961) e Ig-CH1 (SEQ ID NO: 8962-8976) derivados de anticuerpos sirven como enlaces útiles entre el vL/vH y los adaptadores de señalización o la cadena de señalización (*p.ej.*, CD16). Otros dominios similares a Ig son conocidos en la técnica (; SEQ ID NO (DNA): 597-614, 21451-21456 y SEQ ID NO (PRT):8977-8994, 21466-21471 y pueden servir como enlazadores útiles en una realización alternativa de la divulgación.

[00280] En una realización, el enlazador comprende el dominio constante similar a Ig de una cadena TCR y comprende además un péptido de conexión TCR. Ejemplos de tales enlazadores similar a Ig largos se proporcionan en SEQ ID NO: 22827-22829, 22833-22835, 22839-22840, 22843-22844, respectivamente. Los enlazadores largos similares a Ig también incluyen variantes funcionales y homólogos que codifican polipéptidos con al menos un 75% de identidad de secuencia con los polipéptidos codificados por las secuencias anteriores. En una realización, el

enlazador largo similar a Ig comprende mutantes de delección N-terminal o C-terminal de en SEQ ID NO (DNA): 22827-22829, 22833-22835, 22839-22840, 22843-22844, respectivamente, en los que se suprimen entre 1-40 (*p.ej.*, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40) residuos de aminoácidos N-terminal o C-terminal codificados.

[00281] En una realización, un CD16-SAR de doble cadena comprende dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, vL/vH, V/V α β o V/V γ δ , scFv, Fab, vHH, andamiajes de unión a antígeno no inmunoglobulina, DARPIN, receptor, citocina/ligandos, adaptadores, etc.) unidos a dos cadenas mediante enlazadores opcionales en los que cada cadena comprende un dominio transmembrana CD16. En una realización, una o ambas cadenas carecen de un dominio citosólico. En una realización, una o ambas cadenas comprenden un dominio citosólico parcial.

[00282] En una realización, al menos una cadena del CD16-SAR de doble cadena comprende el dominio extracelular CD16 que comprende ambos dominios similares a inmunoglobulina (es decir, D1 y D2) que está unido a través del dominio bisagra CD16 al dominio transmembrana CD16. Un CD16-SAR de doble cadena puede comprender además un AABD unido al N-terminal o cerca del N-terminal de las cadenas vL, vH, V α , V β , V γ o V δ que comprenden el dominio de unión a antígeno del SAR mediante enlazadores opcionales.

[00283] En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR de doble cadena que comprende cadenas CD16 mutantes (*p.ej.*, mutación S213Y y/o carente de dominio citoplasmático) donde una o ambas cadenas comprenden una región parcial o completa de CD16. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR de doble cadena que comprende cadenas CD16 mutantes (*p.ej.*, mutación S213Y y/o carente de dominio citoplasmático) donde una o ambas cadenas comprenden una región parcial o completa del dominio extracelular CD16. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR de doble cadena que comprende cadenas CD16 mutantes (*p.ej.*, mutación S213Y y/o carente de dominio citoplasmático) donde una o ambas cadenas comprenden una región parcial o completa del dominio CD16 D1. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR de doble cadena que comprende cadenas CD16 mutantes (*p.ej.*, mutación S213Y y/o carente de dominio citoplasmático) donde una o ambas cadenas comprenden una región parcial o completa del dominio CD16 D2 o una variante funcional u homóloga del mismo. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR de doble cadena que comprende cadenas CD16 mutantes (*p.ej.*, mutación S213Y y/o carente de dominio citoplasmático) donde una o ambas cadenas comprenden una región parcial o completa del dominio bisagra CD16 o una variante funcional u homólogo del mismo. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR de doble cadena que comprende cadenas CD16 mutantes (*p.ej.*, mutación S213Y y/o carente de

dominio citoplasmático) donde una o ambas cadenas comprenden un dominio transmembrana CD16 o una variante funcional u homóloga del mismo.

[00284] En una realización, una o ambas cadenas del CD16-SAR de doble cadena comprenden el dominio extracelular CD16 que comprende ambos dominios similares a inmunoglobulina (es decir, D1 y D2) que está unido a través del dominio bisagra CD16 a un dominio transmembrana CD16 mutante. En una realización, el dominio transmembrana CD16 comprende la mutación S213Y. En una realización, una o ambas cadenas de la CD16-SAR de doble cadena comprende el dominio extracelular CD16 que comprende ambos dominios similares a inmunoglobulina (es decir, D1 y D2) que está unido a través del dominio bisagra CD16 a un dominio transmembrana CD16, pero carece de un dominio citoplasmático CD16. En una realización, una o ambas cadenas de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carece de dominio citoplasmático también conserva la capacidad de unirse a la región Fc de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o captador biespecífico/triespecífico y mediar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo. En una realización, una o ambas cadenas del CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprende el dominio extracelular CD16 parcial que comprende el 2º dominio similar a inmunoglobulina (es decir, D2) que se une a través del dominio bisagra CD16 al dominio transmembrana CD16. En una realización, una o ambas cadenas de dicha CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático carece de la capacidad de unirse a la porción Fc de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, ya que contiene únicamente el dominio D2 de CD16 y carece del dominio D1. En una realización, una o ambas cadenas de la CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprende el dominio bisagra CD16 parcial o completo que está unido al dominio transmembrana CD16. En una realización, una o ambas cadenas de dicha CD16-SAR de doble cadena carece de la capacidad de unirse a la porción Fc de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, ya que carece de los dominios D1 y D2.

[00285] En una realización, ambas cadenas de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprenden un dominio de unión a antígeno. En una realización, sólo una de las cadenas de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprende un dominio de unión a antígeno. En una realización, una de las cadenas de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carece de un dominio citoplasmático comprende un dominio de unión a antígeno no natural y la segunda cadena se une

a la porción Fc de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un captador biespecífico/triespecífico a través del dominio extracelular CD16.

[00286] En una realización, una cadena de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprende un dominio de unión a antígeno consistente en un dominio vL y la segunda cadena de CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprende un dominio de unión a antígeno consistente en un dominio vH. En una realización, ambas cadenas de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprenden un dominio de unión a antígeno de la misma clase (es decir, scFv, vHH, FHVH, un anticuerpo de dominio único, un andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, un ligando, o un receptor, etc.). En una realización, cada cadena de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprende un dominio vHH. En una realización, cada cadena de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carece de un dominio citoplasmático comprende un dominio FHVH. En una realización, ambas cadenas de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprenden un dominio de unión a antígeno de diferentes clases (es decir, scFv, vHH, FHVH, un anticuerpo de dominio único, un andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, un ligando, o un receptor, etc.). En una realización de ejemplo, una cadena de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprende un dominio de unión a antígeno derivado de dominio vHH mientras que la segunda cadena comprende un dominio de unión a antígeno derivado de un dominio FHVH.

[00287] Las dos cadenas de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático pueden dirigirse al mismo antígeno (*p.ej.*, CD19) o a antígenos diferentes (*p.ej.*, CD19 y CD20). Las dos cadenas de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático pueden dirigirse a dos epítomos diferentes de un único antígeno (*p.ej.*, CD19) o a dos antígenos diferentes (*p.ej.*, CD19 y CD20). Cada cadena de un SAR de doble cadena puede unirse a un antígeno o a más de un antígeno (*p.ej.*, dos, tres, cuatro, etc.). Cada cadena de un CD16-SAR de doble cadena puede comprender además adaptadores (*p.ej.*, RZIP, EZIP, NKG2D-YA, NKG2D-FA, etc.).

[00288] En otra realización, una o ambas cadenas CD16 de una cadena doble CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático puede comprender además un dominio coestimulador citosólico. En otra realización, una o ambas

cadenas CD16 de una cadena doble CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático puede comprender además un dominio coreceptor citosólico. Los dominios coestimuladores de ejemplo incluyen dominios coestimuladores de CD8a, CD8b y CD4, etc. En otra realización, una o ambas cadenas CD16 de un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático puede comprender además una molécula de señalización citosólica. Los ejemplos de moléculas de señalización incluyen LAT-200-262del (SEQ ID NO: 50029), Lck, Lck-T316I (SEQ ID NO: 50031), SLP-76-224-244del (SEQ ID: 50030), ZAP-70 y mutantes y variantes de las mismas. En una realización, un SAR es un z-CD16-SAR que comprende una cadena que comprende un dominio vL , $V\alpha$, o $V\delta$ enlazado operablemente mediante un enlazador similar a Ig (*p.ej.*, dominio constante IgCL o TCR β), a un polipéptido que codifica el dominio bisagra, transmembrana y citosólico de CD3z y un segundo enlazador polipéptido que comprende un dominio vH , $V\beta$, o $V\gamma$ enlazado operablemente mediante un enlazador similar a Ig (*p.ej.*, IgG1-CH1 o dominio constante TCR α), a un polipéptido que codifica el dominio bisagra y transmembrana CD16 y un dominio citosólico que comprende un dominio coestimulador (*p.ej.*, 4-1BB, CD28, etc.) o un dominio coreceptor (*p.ej.*, CD8a, CD8b, CD4, etc.) o una molécula de señalización (*p.ej.*, Lck, Lck-T316I, LAT-200-262del, SLP-76-224-244del o ZAP70, etc.). En una realización, las moléculas citosólicas coestimuladoras, coreceptores o señalizadoras están unidas al C-terminal del dominio transmembrana CD16. En una realización, las moléculas citosólicas coestimuladoras, coreceptores o señalizadoras están unidas al C-terminal del dominio citosólico CD16. Debe entenderse que los dominios de unión a antígeno pueden intercambiarse. Así, los dominios vL , $V\alpha$ y $V\delta$ podrían unirse a la segunda cadena y, de forma similar, los dominios vH , $V\beta$ y $V\gamma$ podrían unirse a la primera cadena de dicha SAR de doble cadena. En otro aspecto, la primera cadena también puede comprender un dominio coestimulador citosólico (*p.ej.*, 41BB), un coreceptor (*p.ej.*, CD8) o moléculas de señalización (*p.ej.*, Lck o LAT, etc.) que esté presente C-terminal al dominio transmembrana CD3z. En otra realización, la cadena CD3z se sustituye por el FcR γ . En las **Tablas 2A-2E**, se proporcionan ejemplos de zSAR y z-CD16-SAR. En una realización, Va y Vb en las construcciones de las **Tablas 2A-2E** pueden sustituirse por fragmentos vL y vH derivados de anticuerpos. Del mismo modo, los fragmentos vL y vH pueden sustituirse por fragmentos Va y Vb. Se puede cambiar el orden de Va, Vb, vL y vH . Del mismo modo, uno o más fragmentos CD3z pueden sustituirse por fragmentos FcR γ correspondientes. Los dominios enlazadores Ig pueden derivarse de inmunoglobulinas o cadenas constantes TCR. Uno o ambos dominios citosólicos CD3z pueden tener la mutación dQ101.

[00289] Las dos cadenas de CD16A-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carentes de dominio citoplasmático descritas en el presente documento pueden codificarse mediante una única cadena polinucleotídica y traducirse en una única cadena polipeptídica, que posteriormente se escinde en proteínas diferentes. Las dos cadenas de CD16A-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carentes de dominio citoplasmático descritas en el presente documento pueden expresarse utilizando dos promotores distintos y codificarse mediante dos cadenas polinucleotídicas separadas. Las dos cadenas de CD16A-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carentes de dominio citoplasmático descritas en el presente documento pueden codificarse mediante un único vector. Las dos cadenas de CD16A-SARs con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carentes de dominio citoplasmático descritas en el presente documento pueden codificarse mediante un vector diferente. La molécula de ácido nucleico que codifica un CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático puede comprender una o más secuencias líderes (también conocidas como péptido señal). En una realización, cada unidad funcional (*p. ej.*, un dominio de unión a antígeno unido a una cadena CD16 más un enlazador escindible por Furina-SGSG) de un CD16A-SAR puede estar precedida por una secuencia líder que dirige el CD16A-SAR a la superficie celular como una proteína transmembrana de tipo I. En una realización, un CD16A-SAR con un dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático puede comprender una o más secuencias líderes (también conocidas como péptido señal). En una realización, el dominio de unión a antígeno de CD16-SAR es extracelular. En algunas realizaciones, la secuencia líder comprende la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NO: 301-303 y las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8681 a 8683. En algunas realizaciones, las secuencias cortas de ácido nucleico (3-9 ácidos nucleicos) que comprenden sitios de enzimas de restricción se localizan entre las diferentes subunidades de una CD16A-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático, *p.ej.*, entre una secuencia señal y el dominio de unión a antígeno de la CD16-SAR o entre la unión a antígeno y la cadena CD16.

[00290] Los diferentes SAR de la presente divulgación tienen un diseño modular. Por lo tanto, la secuencia que codifica una de las cadenas mutantes CD16 o el adaptador de señalización que comprende un CD16-SAR puede sustituirse por una secuencia que codifica un módulo de señalización diferente. En la **Tabla 7** de la solicitud de patente provisional se proporcionan ejemplos de módulos de señalización. Del mismo modo, los dominios de unión a antígeno pueden sustituirse por otros dominios de unión a antígeno.

[00291] En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona una plataforma novedosa de receptores sintéticos de antígenos, designados CD16-SARs, que contienen dos cadenas, una de

las cuales incorpora la región parcial o completa de CD16 con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático.

[00292] En una realización alternativa, la divulgación proporciona CD16-SARs de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de un dominio citoplasmático donde una o ambas de las cadenas comprenden una región parcial o completa del dominio extracelular CD16. En una realización, la divulgación proporciona CD16-SARs de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carecen de un dominio citoplasmático donde una o ambas cadenas comprenden una región parcial o completa del dominio bisagra CD16. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR de doble cadena con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático donde una o ambas cadenas comprenden un dominio transmembrana CD16. En una realización, la divulgación proporciona un CD16-SAR de doble cadena donde una o ambas cadenas comprenden una delección parcial o total del dominio citosólico CD16.

[00293] La divulgación establece que el fragmento vL de un anticuerpo puede unirse a una cadena CD16 con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático y el fragmento vH puede unirse a la otra cadena de señalización, como CD3z, FcR γ , NKp30, NKp44, NKp46, cadena constante TCR α , cadena constante TCR β , cadena constante TCR γ o cadena constante TCR δ , etc. Alternativamente, la divulgación establece que el fragmento vH de un anticuerpo puede unirse a una cadena CD16 con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático y el fragmento vL puede unirse a la otra cadena de señalización, como CD3z, FcR γ , NKp30, NKp44, NKp46, cadena constante TCR α , cadena constante TCR β , cadena constante TCR γ o cadena constante TCR δ , etc. Cuando las dos cadenas de este tipo (*p.ej.*, vL- mutante CD16 y vH- CD3z) se coexpresan en la misma célula, los fragmentos vL y vH pueden unirse a su antígeno cognado y transmitir una señal de célula T. En particular, las células T que expresan dicho CD16-SAR -heterodimérico con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático cuando se exponen a una línea celular que expresa el antígeno diana cognado pueden activar la señalización NFAT, inducir la producción de IL2, promover la proliferación de células T, promover la activación de células T y ejercer citotoxicidad. En otro ejemplo de realización, las células NK que expresan dicha CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carecen de un dominio citoplasmático cuando se exponen a una línea celular que expresa el antígeno diana afín pueden inducir la producción de IL2, promover la proliferación de células NK, promover la activación de células NK o ejercer citotoxicidad. La expresión y actividad del CD16-SAR -heterodimérico puede aumentarse aún más mediante la incorporación de un enlazador entre el vL/vH y la CD16 y las demás cadenas de señalización (*p.ej.*, CD3z, FcR γ , NKp30, NKp44, NKp46, etc.). En

particular, los dominios IgCL e Ig-CH1 derivados de anticuerpos sirven como enlaces útiles entre los fragmentos vL/vH y CD16 con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático. Otros dominios similares a Ig son conocidos en la técnica y pueden servir como enlazadores útiles en una realización alternativa de la divulgación. La divulgación también proporciona que los fragmentos vL/vH en el SAR anterior pueden sustituirse por dominios V α y V β derivados de un TCR para generar uTCR-SAR.

[00294] También se proporcionan en el presente documento iPSC clonales modificadas genéticamente para comprender, entre otras ediciones contempladas y descritas en el presente documento, un CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático. En una realización, el CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carece de un dominio citoplasmático es un CD16-SAR de alta afinidad o un CD16-SAR no eliminable de alta afinidad (hnCD16-SAR). Las iPSC modificadas genéticamente son capaces de diferenciarse en células efectoras que comprenden el CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático (*p.ej.*, CD16-SAR de alta afinidad o hnCD16-SAR) introducida en las iPSC. En algunas realizaciones, las células efectoras derivadas que comprenden CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carecen de dominio citoplasmático son células NK. En algunas realizaciones, las células efectoras derivadas que comprenden CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carecen de un dominio citoplasmático son células T. En una realización, el CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático (*p.ej.*, CD16-SAR de alta afinidad o hnCD16-SAR) expresada en iPSC o células derivadas de las mismas se une no sólo a anticuerpos ADCC o fragmentos de los mismos, sino también a captadores o ligantes bi-, tri- o multiespecíficos que reconocen los dominios de unión extracelular CD16 o CD64 de dicha CD16-SAR. Como tal, la presente solicitud proporciona una célula efectora derivada o una población celular de la misma, precargada con uno o más anticuerpos ADCC preseleccionados a través de la unión con el dominio extracelular del CD16-SAR expresado en la célula efectora derivada, en una cantidad suficiente para su uso terapéutico en un tratamiento de una afección, una enfermedad, en el que dicho CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carece de un dominio citoplasmático comprende un dominio de unión extracelular de CD64, o de CD16 que tiene FI76V y S197P. En una realización, el dominio de unión a antígeno del CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprende un AABD, un scFv, Fv, dominio extracelular de un receptor, ligando u otro módulo de unión a antígeno no inmunoglobulina. En una realización, el CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprende un dominio de unión a antígeno unido a o cerca del N-terminal del dominio de unión

Fc de CD16 o CD64. En una realización, el CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático comprende además un dominio de unión a antígeno (*p.ej.*, AABD, *p.ej.*, FHVH, chVH, aVH, vHH, Darpin, centyrina, afibodina, etc.) unido a o cerca del N-terminal del dominio de unión Fc de CD16 o CD64.

[00295] En una realización, el CD16-SAR de la divulgación comprende la región de unión Fc de CD32 o CD64 fusionada en marco a CD16 con dominio transmembrana y/o citoplasmático mutante o variante del mismo. En una realización de ejemplo, el orden de los diferentes módulos en tal CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático puede comprender desde NH2 hasta C-terminal lo siguiente:

Dominio de unión a antígeno(n)-Dominio de unión a CD32-Fc-Dominio transmembrana CD16; donde $n = 1, 2, 3$, o más.

Dominio de unión a antígeno(n)-Dominio de unión CD32-Fc-Dominio transmembrana mutante CD16-Dominio citoplasmático CD16; donde $n = 1, 2, 3$, o más.

Dominio de unión a antígeno(n)-Dominio de unión a CD32-Fc-Dominio transmembrana mutante CD16; donde $n = 1, 2, 3$, o más.

[00296] En una realización de ejemplo, el orden de los diferentes módulos en dicha SAR-CD16 con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de dominio citoplasmático puede comprender desde el NH2 al C-terminal lo siguiente:

[00297] Dominio de unión a antígeno(n)-Dominio de unión a CD64-Fc-Dominio transmembrana CD16; donde $n = 1, 2, 3$, o más.

[00298] Dominio de unión a antígeno(n)-Dominio de unión a CD64-Fc-Dominio transmembrana mutante CD16-Dominio citoplasmático CD16; donde $n = 1, 2, 3$, o más.

[00299] Dominio de unión a antígeno(n)-Dominio de unión a CD64-Fc-Dominio transmembrana mutante CD16; donde $n = 1, 2, 3$, o más.

[00300] A diferencia de las células NK primarias, las células T maduras procedentes de una fuente primaria (es decir, fuentes naturales/nativas como la sangre periférica, la sangre del cordón umbilical u otros tejidos de donantes) no expresan CD16. Fue inesperado que las células T maduras que expresan la construcción CD16-SAR exógeno con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carecen de dominio citoplasmático muestren expresión en la superficie celular del CD16-SAR y sean capaces de transmitir una señal de célula (*p.ej.*, señalización NFAT) cuando se exponen a las células que expresan el antígeno diana.

[00301] La divulgación proporciona una célula T derivada que comprende un SAR exógeno basado en CD16 con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carece de un dominio citoplasmático. En algunas realizaciones, el SAR basado en CD16 con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carece de un dominio citoplasmático comprende la secuencia de tipo

salvaje de CD16. En algunas realizaciones, el hnCD16 con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carece de un dominio citoplasmático comprende en la célula T derivada F176V (158V) y S197R (o S197P). En algunas otras realizaciones, el hnCD16 con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carente de un dominio citoplasmático comprendido en la célula T derivada comprende un ectodominio completo o parcial originado a partir de CD64 o puede comprender además al menos uno de dominio transmembrana no nativo, dominio estimulador y dominio de señalización.

[00302] Además de las células NK y T primarias, los CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carentes de un dominio citoplasmático de la divulgación pueden expresarse en líneas celulares inmortalizadas. Las líneas celulares inmortalizadas de ejemplo adecuadas para la expresión de los CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carecen de un dominio citoplasmático de la divulgación incluyen las líneas celulares NK92 y NK92MI. Además, los CD16-SAR con dominio transmembrana CD16 mutante y/o carentes de dominio citoplasmático de la divulgación pueden expresarse en células madre hematopoyéticas pluripotentes (*p.ej.*, células madre CD34+), que pueden diferenciarse para generar células sanguíneas que expresen CD16-SAR pertenecientes a diferentes linajes.

[00303] Las células que expresan el dominio transmembrana CD16 mutante y/o que carecen de un dominio citoplasmático también pueden expresar módulos accesorios que codifican citoquinas (*p.ej.*, IL2 anclada a la membrana, IL15 anclada a la membrana, etc.), interruptores suicidas e interruptores de supervivencia. En SEQ ID NO(DNA) se proporcionan ejemplos de módulos accesorios: 656-667, 904-928, 968-969 y SEQ ID NO (PRT): 9036-9047, 9284-9308, 9348-9349.

[00304] La arquitectura del Receptor Inmune Sintético (SIR) comprende el fragmento vL de un anticuerpo unido a una cadena constante del TCR y el fragmento vH unido a una segunda cadena constante complementaria del TCR que puede formar un heterodímero con la primera cadena constante del TCR. Un problema importante del diseño SIR es el impedimento estérico entre los dominios vL/vH y residuos específicos presentes en las cadenas constantes del TCR, ya que los dominios vL/vH se injertan artificialmente en las cadenas constantes del TCR. Este impedimento estérico entre las cadenas constantes del TCR y los dominios vL/vH puede interferir en la interacción entre los dominios vL y vH del SIR, lo que resulta en una menor afinidad de unión y señalización a través del receptor. Como el impedimento estérico se debe a la interacción entre residuos específicos de los fragmentos vL y vH y residuos específicos de las cadenas constantes del TCR, varía en función de la secuencia de los fragmentos vL y vH utilizados para generar el SIR. Este problema también se observa con otros dominios de unión a antígeno distintos del TCR que pueden utilizarse en la construcción del SIR.

[00305] La toxicidad on-target/off-tumor, el síndrome de liberación de citoquinas y la neurotoxicidad son problemas importantes de la terapia celular y pueden ser fatales. Una posible solución es la generación de SIR de afinidad sintonizada con distintos niveles de afinidad por el antígeno diana. Un enfoque estándar para la generación de constructos CAR de afinidad sintonizada es el uso de mutagénesis CDR para seleccionar dominios de unión a antígeno de baja afinidad (*p.ej.*, scFv). Sin embargo, este método es caro y requiere mucho tiempo. La mutagénesis CDR de los dominios de unión a antígeno también puede conducir a la adquisición de nuevas afinidades de unión, lo que resulta en toxicidad on-target/off-tumor.

[00306] La invención actual proporciona una solución a los problemas anteriores proporcionando un panel de cadenas híbridas que pueden utilizarse en la construcción de un SAR (*p.ej.*, un SIR). Una o dos de estas cadenas híbridas pueden sustituir a una o ambas cadenas TCR de tipo salvaje en caso de impedimento estérico entre el dominio de unión a antígeno (*p.ej.*, vL, vH, scFv, vHH, etc.) que se utiliza en la construcción del SAR (*p.ej.*, SIR) y una o ambas cadenas TCR de tipo salvaje. Las cadenas TCR híbridas también pueden utilizarse para generar rápidamente un gran panel de construcciones SAR (*p.ej.*, SIR) con distintos niveles de afinidad, ahorrando así costes, tiempo y mano de obra. Además, el enfoque HC-SAR no requiere la necesidad de generar un gran panel de nuevos dominios de unión a antígeno, obviando así el riesgo de adquisición de nuevas especificidades de unión a antígeno y toxicidades fuera del tumor.

[00307] Por último, el enfoque HC- SAR (*p.ej.*, HC-SIR) también proporciona una estrategia para prevenir el mal funcionamiento del TCR que explota nuestra comprensión de la biogénesis del TCR. Sin estar limitado por ninguna teoría, la expresión funcional en superficie del complejo TCR implica típicamente el reclutamiento de proteínas CD3 accesorias por dominios invariantes de las dos cadenas polipeptídicas del TCR. La interrupción de las interacciones TCR-CD3 puede anular tanto la expresión superficial como la señalización del complejo TCR. En consecuencia, puede ser útil evitar por completo el emparejamiento erróneo de las cadenas introducidas y endógenas, eliminando así el riesgo de autoinmunidad y maximizando la expresión en superficie del heterodímero TCR terapéutico. Además, puede ser útil que las modificaciones realizadas en las cadenas de TCR introducidas minimicen o eviten las secuencias extrañas, al menos en el sentido de que se contempla que la ausencia de secuencias extrañas puede minimizar la inmunogenicidad y evitar el desarrollo de anticuerpos contra los TCR introducidos. Se observa que los SIR de cadena híbrida de acuerdo con algunas realizaciones del presente documento pueden minimizar o evitar la desadaptación, mientras que también comprenden secuencias del organismo huésped (*p.ej.*, TCR totalmente humanos para un huésped humano) para minimizar la inmunogenicidad contra el HC-SAR.

[00308] Se proporcionan varias configuraciones HC-SAR adecuadas de acuerdo con algunas realizaciones del presente documento.

[00309] Las cadenas HC-SAR (*p.ej.*, HC-SIR) pueden comprender varios dominios, incluyendo el dominio constante (C), el péptido conector (ConnP), el dominio transmembrana (TM) y la cola citoplasmática (CP o IC). El dominio constante de un SIR comprende dominios enlazadores similares a inmunoglobulinas (similar a Ig). Ejemplos de dominios enlazadores similares a Ig derivados de dominios constantes de TCR e inmunoglobulinas se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 581-614; 19751-19756) y SEQ ID NO (PRT): 8960 a 8994, 20371-20376. En una realización, los dominios constantes de TCR y los dominios constantes de anticuerpo usados en la construcción del HC-SAR (*p.ej.*, HC-SIR) comprenden mutantes de delección N-terminal y C-terminal de los mismos a los que les faltan entre 1-50 aminoácidos (*p.ej.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50). En algunas realizaciones, el dominio constante de las cadenas TCR comprende mutaciones que dan lugar a la formación de un enlace disulfuro entre las dos cadenas TCR. Ejemplos de mutaciones incluyen T48C en el dominio constante TCRA (enlazador similar a Ig) y S57C en el dominio constante TCRB (dominio de enlace similar a Ig).

[00310] En las **Tablas 2F-2J** se exponen diversas configuraciones para las cadenas de un HC-SAR (*p.ej.*, HC-SIR) de acuerdo con algunas de las realizaciones del presente documento. Se contempla que versiones sintéticas y variantes de cualquiera o todos los dominios indicados pueden ser útiles en HC-SIRs de acuerdo con algunas realizaciones del presente documento. Como tal, a menos que se indique lo contrario, los dominios C, ConnP, TM y CP(IC) se contemplan para abarcar versiones naturales y sintéticas de los dominios indicados. En algunas realizaciones, el HC-SIR comprende variantes sintéticas de dominios humanos naturales. En algunas realizaciones, el HC-SIR es una quimera de variantes sintéticas de dominios humanos naturales y de especies no humanas. En algunas realizaciones, el HC-SAR (*p.ej.*, HC-SIR) comprende variantes sintéticas de dominios murinos naturales. En algunas realizaciones, el HC-SAR (*p.ej.*, HC-SIR) es una quimera de variantes sintéticas de dominios humanos y dominios murinos naturales. En algunas realizaciones, el HC-SIR es una quimera de variantes sintéticas de dominios humanos naturales y de especies no humanas.

[00311] De acuerdo con algunas realizaciones del presente documento, HC-SAR (*p.ej.*, HC-SIR) puede ser enteramente de un organismo. Opcionalmente, el HC-SAR (*p.ej.*, HC-SIR) puede ser quimérico, comprendiendo una combinación de dominios de dos organismos diferentes (*p.ej.*, humano y murino). Por ejemplo, los SIR quiméricos que comprenden cadenas constantes de TCR humano murinizada se describen en el documento WO 2018/102795 A1, que en el presente documento se incorpora por referencia en su totalidad. Sin estar limitado por ninguna

teoría, se contempla que los HC-SAR completamente humanos y/o quiméricos (*p.ej.*, HC-SIR) tienen menos probabilidades de ser inmunogénicos en un huésped humano que los HC-SIR murinos. En algunas realizaciones, se proporciona un HC-SAR quimérico (*p.ej.*, HC-SIR). En algunas realizaciones, los dominios del HC-SIR son totalmente humanos. En algunas realizaciones, los dominios del HC-SAR (*p.ej.*, HC-SIR) son totalmente derivados de una especie no humana. En algunas realizaciones, los dominios del HC-SIR son totalmente murinos. En algunas realizaciones, el HC-SAR es una quimera de dominios humanos y dominios no humanos. En algunas realizaciones, el HC-SAR es una quimera de dominios humanos y dominios murinos.

[00312] De acuerdo con la Alternativa 1, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig) de la cadena alfa (cadena TCR α), y el péptido de conexión, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena beta (cadena TCR β), y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig) de la cadena beta, y el péptido de conexión, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena alfa. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-C_{alfa}-ConnP_{beta}-TM_{beta}-CP_{beta}; segunda cadena: vH-C_{beta}-ConnP_{alfa}-TM_{alfa}-CP_{alfa}.

[00313] De acuerdo con la Alternativa 2, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo, el dominio constante (o dominio enlazador similar a Ig) y el péptido conector de la cadena alfa y el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena beta, y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo, el dominio constante (o dominio enlazador similar a Ig) y el péptido conector de la cadena beta combinados con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena alfa. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-C_{alfa}-ConnP_{alfa}-TM_{beta}-CP_{beta}; segunda cadena: vH-C_{beta}-ConnP_{beta}-TM_{alfa}-CP_{alfa}.

[00314] De acuerdo con la Alternativa 3, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL, el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig) de la cadena gamma (cadena TCR γ) y el péptido de conexión, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena delta (cadena TCR δ), y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH, el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig) de la cadena delta y el péptido de conexión, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena gamma. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-C_{gamma}-ConnP_{delta}-TM_{delta}-CP_{delta}; segunda cadena: vH-C_{delta}-ConnP_{gamma}-TM_{gamma}-CP_{gamma}.

[00315] De acuerdo con la alternativa 4, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el vL, dominio constante (o dominio enlazador similar a Ig) y péptido

conector de la cadena gamma y el dominio transmembrana y cola citoplasmática de la cadena delta, y recíprocamente, en la segunda cadena, el vH, dominio constante (o dominio enlazador similar a Ig) y péptido conector de la cadena delta y el dominio transmembrana y cola citoplasmática de la cadena gamma. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como:

primera cadena: vL-C_{gamma}-ConnP_(gamma)-TM_{delta}-CP_{delta}; segunda cadena: vH-C_{delta}-ConnP_{delta}-TM_{gamma}-CP_{gamma}.

[00316] De acuerdo con la Alternativa 5, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio enlazador similar a Ig) de la cadena alfa, y el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena delta, y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio enlazador similar a Ig) de la cadena beta, y el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena gamma.

Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-C_{alfa}-ConnP_{delta}-TM_{delta}-CP_{delta}; segunda cadena: vH-C_{beta}-ConnP_{gamma}-TM_{gamma}-CP_{gamma}.

[00317] De acuerdo con la alternativa 6, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig) de la cadena alfa, y el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena delta, y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig), el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena gamma o beta. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-C_{alfa}-ConnP_{delta}-TM_{delta}-CP_{delta}; segunda cadena: vH-C_{gamma}-ConnP_{gamma}-TM_{gamma}-CP_{gamma} o vH-C_{beta}-ConnP_{beta}-TM_{beta}-CP_{beta}.

[00318] De acuerdo con la alternativa 7, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig) de la cadena delta, y el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena alfa, y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig), el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena gamma o beta. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-C_{delta}-ConnP_{alfa}-TM_{alfa}-CP_{alfa}; segunda cadena: vH-C_{gamma}-ConnP_{gamma}-TM_{gamma}-CP_{gamma} o vH-C_{beta}-ConnP_{beta}-TM_{beta}-CP_{beta}.

[00319] De acuerdo con la alternativa 8, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig) de la cadena beta, y el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena gamma, y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig), el péptido conector, el

dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena alfa o delta. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-C_{beta}-ConnP_{gamma}-TM_{gamma}-CP_{gamma}; segunda cadena: vH-C_{alpha}-ConnP_{alpha}-TM_{alpha}-CP_{alpha} o vH-C_{delta}-ConnP_{delta}-TM_{delta}-CP_{delta}

[00320] Según la alternativa 9, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig) de la cadena gamma, y el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena beta, y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio de enlace similar a Ig), el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena alfa o delta. Esquemáticamente, esto puede diagramarse como: primera cadena: vL-C_{gamma}-ConnP_{beta}-TM_{beta}-CP_{beta}; segunda cadena: vH-C_{alfa}-ConnP_{alfa}-TM_{alfa}-CP_{alfa} o vH-C_{delta}-ConnP_{delta}-TM_{delta}-CP_{delta}

[00321] De acuerdo con la Alternativa 10, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio Ig) de una cadena de anticuerpos (*p.ej.*, IgCL), el péptido conector de la cadena gamma, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena beta, y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo, el dominio constante (o dominio Ig) de un anticuerpo (*p.ej.*, IgG1-CH1 o IgG1-CH4), el péptido conector de la cadena delta, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena alfa. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-IgCL-ConnP_{gamma}-TM_{beta}-CP_{beta}; segunda cadena: vH-IgG1-CH1-ConnP_{delta}-TM_{alfa}-CP_{alfa}.

[00322] De acuerdo con la Alternativa 11, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio Ig) de una cadena de anticuerpos (*p.ej.*, IgCL), el péptido conector de la cadena gamma, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena beta, y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo, el dominio constante (o dominio Ig) de un anticuerpo (*p.ej.*, IgG1-CH1 o IgG1-CH4), el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena alfa. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-IgCL-ConnP_{gamma}-TM_{beta}-CP_{beta}; segunda cadena: vH-IgG1-CH1-ConnP_{alfa}-TM_{alfa}-CP_{alfa}.

[00323] De acuerdo con la Alternativa 12, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio Ig) de una cadena de anticuerpos (*p.ej.*, IgCL), el péptido conector de la cadena gamma, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena beta, y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo, el dominio constante (o dominio Ig) de un anticuerpo (*p.ej.*, IgG1-CH1 o IgG1-CH4), el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola

citoplasmática de la cadena delta. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-IgCL-ConnP_{gamma}-TM_{beta}-CP_{beta}; segunda cadena: vH-IgG1-CH1-ConnP_{delta}-TM_{delta}-CP_{delta}.

[00324] De acuerdo con la Alternativa 13, el HC-SAR comprende dos cadenas polipeptídicas: en la primera cadena, el dominio vL de un anticuerpo y el dominio constante (o dominio Ig) de una cadena de anticuerpos (*p.ej.*, IgCL), el péptido conector de la cadena beta, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena gamma, y recíprocamente, en la segunda cadena, el dominio vH de un anticuerpo, el dominio constante (o dominio Ig) de un anticuerpo (*p.ej.*, IgG1-CH1 o IgG1-CH4), el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena alfa o de la cadena delta. Esquemáticamente, esto se puede diagramarse como: primera cadena: vL-IgCL-ConnP_{beta}-TM_{gamma}-CP_{gamma}; segunda cadena: vH-IgG1-CH1-ConnP_{alfa}-TM_{alfa}-CP_{alfa} o vH-IgG1-CH1-ConnP_{delta}-TM_{delta}-CP_{delta}.

[00325] Se entiende que los dominios vL y vH en los diseños anteriores pueden intercambiarse, de modo que la primera cadena comprenda el dominio vH y la segunda cadena comprenda el dominio vL. Los dominios vL y vH se unen para crear un dominio Fv que se une a un antígeno diana con alta especificidad. Se entiende que los dominios IgCL e IgG1-CH1 en los diseños anteriores pueden intercambiarse. Además, se conocen varios dominios IgG-CH (*p.ej.*, SEQ ID NO:8963-8976) y pueden sustituir al dominio IgG1-CH1 (SEQ ID NO (PRT): 8962). También se entiende que el dominio constante TCR puede cambiar uno o ambos dominios enlazadores Ig. Así, la primera cadena puede comprender un dominio constante TCR (*p.ej.*, SEQ ID NO:8977- 8994) y la segunda cadena puede comprender un dominio enlazador Ig (*p.ej.*, IgG1-CH1).

[00326] También se entiende que los dominios CP en cualquiera de los diseños anteriores pueden intercambiarse. Así, CP_(delta) puede cambiarse por un CP_(beta).

[00327] En una realización, los dominios de anticuerpo vL y vH del HC-SAR descrita anteriormente se sustituyen por uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR como scFv, vHH, anticuerpo de dominio variable único, FHVH (dominio vH totalmente humano), SVH (dominio vH único), SVL (dominio vL único), andamiaje de unión a antígeno no inmunoglobulina (*p.ej.*, centyrina, afibodina, Darpin, dominio D, etc.), dominio de unión a ligando de un receptor, dominio de unión a receptor de un ligando, autoantígeno, dominio de unión a adaptador, epítipo y mimotopo, etc.

[00328]

[00329] En una realización, la divulgación proporciona al menos un polinucleótido recombinante que codifica al menos un receptor de antígeno sintético de cadena híbrida (HC-SIR), o su variante funcional, el al menos un SAR o su variante funcional que comprende un

heterodímero de cadenas constantes de receptor de células T (TCR), el heterodímero que tiene uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR. En una realización, al menos una cadena constante TCR del HC-SAR es una cadena TCR híbrida. En una realización, la cadena TCR híbrida comprende al menos un dominio seleccionado del grupo de dominio constante de cadena TCR (C), péptido de conexión de cadena TCR (ConnP), dominio transmembrana de cadena TCR (TM) y dominio citoplasmático de cadena TCR (CP) que es heterólogo. En una realización, la cadena TCR híbrida comprende al menos un dominio seleccionado del grupo de dominio constante de la cadena TCR (C), péptido conector de la cadena TCR (ConnP) y dominio citoplasmático de la cadena TCR (CP) que es heterólogo al dominio transmembrana (TM) de la cadena TCR. En una realización, la cadena TCR híbrida comprende al menos un dominio seleccionado del grupo de dominio constante de la cadena TCR (C), dominio transmembrana de la cadena TCR (TM) y dominio citoplasmático de la cadena TCR (CP) que es heterólogo del péptido conector de la cadena TCR (ConnP). En una realización, el HC-SAR carece de un dominio variable de la cadena TCR.

[00330] En una realización, al menos un dominio del HC-SAR que es heterólogo al TM de la cadena TCR híbrida se deriva de a) una cadena TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α que carece del dominio transmembrana de la cadena TCR presente en la cadena TCR híbrida; b) una cadena TCR con un dominio transmembrana con menos del 50% de identidad de secuencia con el TM de la cadena TCR híbrida; c) una cadena TCR constante o una variante funcional de una especie diferente; d) cualquier combinación de (a), (b) y (c).

[00331] En una realización, más de un dominio seleccionado del grupo de dominio constante (C), péptido conector (ConnP) y dominio citoplasmático (CP) es heterólogo del dominio transmembrana (TM). En una realización, ConnP es heterólogo de a) el dominio TM; b) el dominio constante (C); c) de ambos a) y b).

[00332] En una realización, el dominio TM del HC-SAR codifica un péptido con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 31985-88 y 31992, y/o un péptido con una secuencia seleccionada del grupo de dominios transmembrana con SEQ ID NO: 40606 a 40670 y 40737-40758 o una variante funcional o un homólogo con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos excepto en los residuos 7, 12, 17 y 21; y/o b) dominio transmembrana con SEQ ID NO: 40671-40708 o una variante funcional o un homólogo con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos excepto en los residuos 6, 12 y 16.

[00333] En una realización, el dominio constante (C) de la cadena híbrida se deriva de una inmunoglobulina. En una realización, el dominio constante de al menos una cadena híbrida se deriva de una inmunoglobulina. En una realización, los dominios constantes de ambas cadenas híbridas derivan de una inmunoglobulina.

[00334] En una realización, ambas cadenas constantes TCR del HC-SAR son cadenas híbridas.

[00335] En una realización, la primera cadena híbrida del HC-SAR comprende un primer dominio transmembrana de cadena TCR, un dominio de unión a antígeno no-TCR y un segundo dominio constante de cadena TCR o una variante funcional o un fragmento del mismo, pero no comprende un primer dominio constante de cadena TCR. En una realización, la segunda cadena TCR híbrida comprende un segundo dominio transmembrana de cadena TCR, un dominio opcional de unión a antígeno no-TCR y un primer dominio constante de cadena TCR o una variante funcional o un fragmento del mismo, pero no comprende un segundo dominio constante de cadena TCR. En una realización, el primer dominio constante de cadena TCR comprende un dominio constante de cadena TCR alfa o gamma o una variante funcional o fragmento del mismo. En una realización, el primer dominio transmembrana de cadena TCR comprende un dominio transmembrana de cadena TCR alfa o gamma o una variante funcional del mismo. En una realización, el segundo dominio constante de cadena TCR comprende un dominio constante de cadena TCR beta o delta o una variante funcional o fragmento del mismo. En una realización, el segundo dominio transmembrana de cadena TCR comprende un dominio transmembrana de cadena TCR beta o delta o una variante del mismo. En una realización, el primer dominio constante de cadena TCR comprende un dominio constante de cadena TCR alfa o delta o una variante funcional o fragmento del mismo. En una realización, el primer dominio transmembrana de cadena TCR comprende un dominio transmembrana de cadena TCR alfa o delta o una variante funcional del mismo. En una realización, el segundo dominio constante de cadena TCR comprende un dominio constante de cadena TCR beta o gamma o una variante funcional o un fragmento del mismo. En una realización, el segundo dominio transmembrana de cadena TCR comprende un dominio transmembrana de cadena TCR beta o gamma o una variante del mismo.

[00336] En una realización, la primera cadena TCR híbrida comprende además un segundo péptido conector de cadena TCR o una variante funcional o fragmento del mismo, pero no comprende un primer péptido conector de cadena TCR. En una realización, la segunda cadena híbrida de TCR comprende además un primer péptido conector de cadena de TCR o una variante funcional o fragmento del mismo, pero no comprende un segundo péptido conector de cadena de TCR. En una realización, el primer péptido conector de cadena TCR comprende un péptido conector de cadena TCR alfa o gamma o una variante funcional o fragmento del mismo y el segundo péptido conector de cadena TCR comprende un péptido conector de cadena TCR beta o delta o una variante funcional o fragmento del mismo. En una realización, el primer péptido conector de cadena TCR comprende un péptido conector de cadena TCR alfa o delta o una

variante funcional o fragmento del mismo y el segundo péptido conector de cadena TCR comprende un péptido conector de cadena TCR beta o gamma o una variante funcional o fragmento del mismo.

[00337] En una realización, el HC-SAR comprende: a) una primera cadena polipeptídica que comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vH, un dominio constante TCR o una variante o fragmento funcional del mismo y un primer dominio de receptor de células T (TCRD) que comprende un primer dominio transmembrana de una primera subunidad TCR; y b) una segunda cadena polipeptídica que comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vL, un dominio constante TCR o una variante funcional o fragmento del mismo y un segundo TCRD que comprende un segundo dominio transmembrana de una segunda subunidad TCR, en el que el dominio de anticuerpo vH del primer dominio de unión a antígeno y el dominio de anticuerpo vL del segundo dominio de unión a antígeno forman un módulo de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno diana. En una realización alternativa, el HC-SAR comprende a) una primera cadena polipeptídica que comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vL, un dominio constante TCR o una variante funcional o fragmento del mismo de una primera subunidad TCR y un dominio receptor de células T (TCRD) que comprende un primer dominio transmembrana de una segunda subunidad TCR; y b) una segunda cadena polipeptídica que comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vH, un dominio constante TCR o una variante funcional o fragmento del mismo de la segunda subunidad TCR y un segundo TCRD que comprende un segundo dominio transmembrana de la primera subunidad TCR. En una realización, el dominio de anticuerpo vH del primer dominio de unión a antígeno y el dominio de anticuerpo vL del segundo dominio de unión a antígeno forman un módulo de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno diana. En una realización, (i) la primera subunidad TCR es una cadena TCR γ y la segunda subunidad TCR es una cadena TCR δ o TCR α ; o (ii) la primera subunidad TCR es una cadena TCR δ y la segunda subunidad TCR es una cadena TCR γ o TCR β ; o (iii) la primera subunidad TCR es una cadena TCR α y la segunda subunidad TCR es una cadena TCR β o TCR γ ; o (iv) la primera subunidad TCR es una cadena TCR β y la segunda subunidad TCR es una cadena TCR α o TCR δ . En una realización, la primera cadena polipeptídica comprende además un péptido de conexión TCR o una variante funcional o fragmento del mismo y la segunda cadena polipeptídica comprende además un péptido de conexión TCR o una variante funcional o fragmento del mismo. En una realización, uno o ambos péptidos de conexión son heterólogos a) del dominio transmembrana; b) del dominio constante; c) de ambos a) y b). En una realización, el primer TCRD y el segundo TCRD

forman un módulo receptor de células T (TCRM) que es capaz de reclutar al menos un módulo de señalización asociado al TCR. En una realización, el TCRM es un TCRM no canónico. En una realización, el TCRM es un TCRM no canónico interespecífico.

[00338] En una realización, la divulgación proporciona un HC-SAR que se une específicamente a un antígeno diana, que comprende: a) una primera cadena polipeptídica que comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vH, un dominio de anticuerpo constante o una variante funcional o fragmento de los mismos y un primer dominio de receptor de células T (TCRD) que comprende un primer dominio transmembrana de una primera subunidad TCR; y b) una segunda cadena polipeptídica que comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vL, un dominio constante del TCR o una variante funcional o fragmento del mismo y un segundo TCRD que comprende un segundo dominio transmembrana de una segunda subunidad del TCR, en el que el dominio de anticuerpo VH del primer dominio de unión a antígeno y el dominio de anticuerpo VL del segundo dominio de unión a antígeno forman un módulo de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno diana, o c) una primera cadena polipeptídica que comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vL, un dominio de anticuerpo constante o una variante funcional o fragmento del mismo y un dominio de receptor de células T (TCRD) que comprende un primer dominio transmembrana de una primera subunidad TCR; y d) una segunda cadena polipeptídica que comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vH, un dominio constante TCR o una variante funcional o fragmento del mismo y un segundo TCRD que comprende un segundo dominio transmembrana de una segunda subunidad TCR. En una realización, el dominio de anticuerpo vH del primer dominio de unión a antígeno y el dominio de anticuerpo vL del segundo dominio de unión a antígeno forman un módulo de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno diana. En una realización, (i) la primera subunidad TCR es una cadena TCR γ , y la segunda subunidad TCR es una cadena TCR δ o TCR α ; o (ii) la primera subunidad TCR es una cadena TCR δ , y la segunda subunidad TCR es una cadena TCR γ o TCR β ; o (iii) la primera subunidad TCR es una cadena TCR α , y la segunda subunidad TCR es una cadena TCR β o TCR γ ; o (iv) la primera subunidad TCR es una cadena TCR β , y la segunda subunidad TCR es una cadena TCR α o TCR δ . En una realización, la primera cadena polipeptídica comprende además un péptido de conexión TCR o una variante funcional o fragmento del mismo y la segunda cadena polipeptídica comprende además un péptido de conexión TCR o una variante funcional o fragmento del mismo. En una realización, uno o ambos péptidos conectores son heterólogos a) del dominio transmembrana; b) del dominio constante; c) de ambos a) y b). En una realización, el primer TCRD y el segundo

TCRD forman un módulo receptor de células T (TCRM) que es capaz de reclutar al menos un módulo de señalización asociado al TCR. En una realización, el TCRM es un TCRM no canónico. En una realización, el TCRM es un TCRM no canónico interespecífico.

[00339] En una realización, la divulgación proporciona un HC-SAR en la que ambas cadenas constantes del TCR comprenden dominios constantes de anticuerpos que se unen en el marco a los dominios del péptido conector (ConnP), TM (transmembrana) y CP (citoplasmático, también denominado intracelular o IC) de las cadenas del TCR. En una realización, los dominios ConnP, TM e IC de dicha HC-SAR son heterólogos entre sí, es decir, no derivan de la misma cadena constante de TCR.

[00340] En una realización, la divulgación proporciona un HC-SAR que se une específicamente a un antígeno diana, que comprende: a) una primera cadena polipeptídica que comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vH, un primer dominio de anticuerpo constante o una variante funcional o fragmento del mismo y un primer dominio de receptor de células T (TCRD) que comprende un primer dominio ConnP, TM y CP de una primera subunidad TCR; y b) una segunda cadena polipeptídica que comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vL, un segundo dominio de anticuerpo constante o una variante funcional o fragmento del mismo y un segundo TCRD que comprende un segundo dominio ConnP, TM y CP de una segunda subunidad TCR, en el que el dominio de anticuerpo vH del primer dominio de unión a antígeno y el dominio de anticuerpo vL del segundo dominio de unión a antígeno forman un módulo de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno diana, o c) una primera cadena polipeptídica que comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vL, un primer dominio de anticuerpo constante o una variante funcional o fragmento del mismo y un primer dominio de receptor de células T (TCRD) que comprende un primer dominio ConnP, TM y CP de una primera subunidad TCR; y d) una segunda cadena polipeptídica que comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende un dominio de anticuerpo vH, un segundo dominio de anticuerpo constante o una variante funcional o fragmento del mismo y un segundo TCRD que comprende un segundo dominio ConnP, TM y CP de una segunda subunidad TCR, en el que el dominio de anticuerpo vH del primer dominio de unión a antígeno y el dominio de anticuerpo vL del segundo dominio de unión a antígeno forman un módulo de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno diana. En una realización, el primer TCRD y el segundo TCRD forman un módulo receptor de células T (TCRM) que es capaz de reclutar al menos un módulo de señalización asociado al TCR. En una realización, el TCRM es un TCRM no canónico. En una realización, el TCRM es un TCRM no canónico interespecífico.

[00341] En una realización, la divulgación proporciona un HC-TCR en el que una o ambas cadenas constantes del TCR comprenden dominios constantes de anticuerpos que se unen en el marco a los dominios de péptido conector (ConnP), TM (transmembrana) y CP (citoplasmático, también denominado intracelular o IC) de las cadenas del TCR. En una realización, los dominios ConnP, TM e IC de dicho HC-TCR son heterólogos entre sí, es decir, no derivan de la misma cadena constante de TCR.

[00342] En una realización, la divulgación proporciona un HC-TCR que se une específicamente a un antígeno peptídico diana, que comprende: a) una primera cadena polipeptídica que comprende un primer dominio de unión a antígeno TCR que comprende un dominio $V\alpha$ o $V\gamma$, un primer dominio de anticuerpo constante o una variante funcional o fragmento del mismo y un primer dominio de receptor de células T (TCRD) que comprende un primer dominio ConnP, TM y CP de una primera subunidad TCR; y b) una segunda cadena polipeptídica que comprende un segundo dominio de unión a antígeno TCR que comprende un dominio $V\beta$ o $V\delta$, un segundo dominio de anticuerpo constante o una variante funcional o fragmento del mismo y un segundo TCRD que comprende un segundo dominio ConnP, TM y CP de una segunda subunidad TCR. En una realización, el dominio TCR $V\alpha$ o $V\gamma$ del primer dominio de unión a antígeno y el dominio de anticuerpo $V\beta$ o $V\delta$ del segundo dominio de unión a antígeno forman un módulo de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno peptídico diana de manera dependiente o independiente del CMH.

En una realización, el primer TCRD y el segundo TCRD forman un módulo receptor de células T (TCRM) que es capaz de reclutar al menos un módulo de señalización asociado al TCR. En una realización, el TCRM es un TCRM no canónico. En una realización, el TCRM es un TCRM no canónico interespecífico. Los dominios de unión a antígeno de TCR de ejemplo son dominios variables (*p.ej.*, $V\alpha$ y $V\beta$) de TCR que son capaces de unir péptidos derivados de NY-ESO-1, MAGE-A4, WT-1, PRAME en presencia de la molécula HLA-A2 (**Tabla 4**). Ejemplos de tales HC-TCR se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 40512-40513.

[00343] . En una realización de ejemplo, los dominios de enlace similar a Ig derivados de dominios constantes de TCR y anticuerpos (inmunoglobulinas) se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 581-614; 19751-19756) y SEQ ID NO (PRT): 8960 a 8994, 20371-20376. En una realización, los dominios constantes de anticuerpo comprenden variantes funcionales y fragmentos de los anteriores con al menos un 75% (*p.ej.*, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.9%, etc.) de identidad de secuencia a nivel de proteína, incluyendo variantes de especies no humanas. En una realización, el primer o el segundo dominio de anticuerpo constante es un dominio enlazador de Ig (*p.ej.*, IgG1-CH1. SEQ ID NO :582-596) y el segundo o el primer dominio de anticuerpo constante es un dominio enlazador de Ig (*p.ej.*, IgG-CL; SEQ

ID NO: 581). En una realización, el dominio constante TCR es un dominio enlazador similar a Ig representado por SEQ ID NO: 597-614; 19751-19756 y SEQ ID (PRT): 8977-8994, 20371-20376. En una realización, los dominios constantes del anticuerpo comprenden variantes funcionales y fragmentos de los mismos con al menos un 75% (*p.ej.*, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.9%, etc.) de identidad de secuencia a nivel proteico, incluyendo variantes de especies no humanas. En una realización, los dominios constantes de anticuerpo y TCR comprenden mutantes de delección N-terminal y C-terminal de los mismos a los que les faltan entre 1-50 aminoácidos (*p.ej.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50).

[00344] En una realización, el péptido de conexión se deriva de TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α . Los péptidos de conexión de ejemplo están representados por SEQ ID NO (PRT): 8995-9002.

[00345] En una realización, el péptido conector de HC-SAR se deriva de TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α . Los péptidos de conexión de ejemplo están representados por SEQ ID NO (PRT): 8995-9002. En una realización, el péptido de conexión se deriva de la misma cadena TCR que el dominio transmembrana. Por ejemplo, tanto el péptido conector como el dominio transmembrana se derivan de la cadena TCR α humana. En una realización, el péptido conector se deriva de la misma cadena TCR que el dominio constante TCR. Por ejemplo, tanto los péptidos de conexión como el dominio constante del TCR se derivan de la cadena del TCR α humano. En una realización, el péptido de conexión se deriva de una cadena TCR diferente a la del dominio transmembrana. Por ejemplo, el péptido conector se deriva de la cadena TCR β humana y el dominio transmembrana se deriva de la cadena TCR α humana. En una realización, el péptido conector se deriva de una cadena TCR diferente como el dominio constante TCR. Por ejemplo, el péptido conector se deriva de la cadena TCR β humana y el dominio constante TCR se deriva de la cadena TCR α humana.

[00346] En una realización, los dominios ConnP, TM y CP de al menos una subunidad TCR son heterólogos. En una realización, los dominios ConnP y TM de al menos una subunidad TCR son heterólogos. En una realización, los dominios ConnP, TM y CP de ambas subunidades TCR son heterólogos. En una realización, los dominios ConnP y TM de ambas subunidades TCR son heterólogos.

[00347] En una realización, la primera subunidad TCR comprende el ConnP del TCR β y el TM del TCR γ y la segunda subunidad TCR es el TCR α o el TCR δ . En una realización, la primera subunidad TCR comprende el ConnP del TCR γ y el TM del TCR β y la segunda subunidad TCR es el TCR α o el TCR δ . En una realización, la primera subunidad TCR

comprende el ConnP del TCR α y el TM del TCR δ y la segunda subunidad TCR es el TCR β o el TCR γ . En una realización, la primera subunidad TCR comprende el ConnP del TCR δ y el TM del TCR α y la segunda subunidad TCR es el TCR β o el TCR γ

[00348] En una realización, la primera subunidad TCR comprende el ConnP del TCR β y el TM del TCR γ y la segunda subunidad TCR comprende el ConnP del TCR α y el TM del TCR δ o el ConnP del TCR δ y el TM del TCR α . En una realización, la primera subunidad TCR comprende el ConnP del TCR γ y el TM del TCR β y la segunda subunidad TCR comprende el ConnP del TCR α y el TM del TCR δ o el ConnP del TCR δ y el TM del TCR α . En una realización, la primera subunidad TCR comprende el ConnP del TCR α y el TM del TCR δ y la segunda subunidad TCR comprende el ConnP del TCR β y el TM del TCR γ o el ConnP del TCR γ y el TM del TCR β . En una realización, la primera subunidad TCR comprende el ConnP del TCR δ y el TM del TCR α y la segunda subunidad TCR comprende el ConnP del TCR β y el TM del TCR γ o el ConnP del TCR γ y el TM del TCR β .

[00349] En una realización, el dominio TM de TCR α , β , γ , δ , y preTCR α está representado por SEQ ID NO (PRT): 31985-88 y 31992, respectivamente. En una realización, un dominio TM de TCR α , TCR δ y preTCR α es un péptido con SEQ ID NO (PRT): 40606-40638 y 40639-40670, 40737-40758 respectivamente, o una variante funcional o un homólogo con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones conservadoras de aminoácidos excepto en los residuos 7, 12, 17 y 21. En una realización, un dominio TM de TCR β y TCR γ es un péptido con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 40671-40708 y 40709-40736, respectivamente o una variante funcional o un homólogo con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos excepto en los residuos 6, 12 y 16.

[00350] Los ejemplos de HC-SAR se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 40162-40171.

[00351] En una realización, los dominios de anticuerpo vL y vH del HC-SAR descrita anteriormente se sustituyen por uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR como scFv, vHH, anticuerpo de dominio variable único, FHVH (dominio vH totalmente humano), SVH (dominio vH único), SVL (dominio vL único), andamiaje de unión a antígeno no inmunoglobulina (*p.ej.*, centyrina, afibodina, DARPIN, dominio D, etc.), dominio de unión a ligando de un receptor, dominio de unión a receptor de un ligando, autoantígeno, dominio de unión a adaptador, epítipo y mimotopo, etc.

[00352] En una realización, la divulgación proporciona un SAR que comprende un heterodímero de dos cadenas en el que cada cadena comprende un C, TM, ConnP y CP y en el que al menos un dominio del SAR se sustituye por un dominio correspondiente de otra especie (*p.ej.*, humano, ratón, mono, etc.). En una realización, el SAR comprende al menos un dominio de unión a antígeno no-TCR que está unido a al menos una de las dos cadenas. En una

realización, al menos una cadena de SAR comprende al menos un dominio transmembrana seleccionado de SEQ ID NO: 31985-88 y 31992. En una realización, ambas cadenas de SAR comprenden un dominio transmembrana seleccionado entre SEQ ID NO: 31985-88 y 31992. En una realización, al menos un dominio de HC-SAR es de origen humano. En una realización, al menos un dominio de HC-SAR es de origen no humano.

[00353] En algunas realizaciones, los dominios de cualquiera de las arquitecturas HC-SAR aquí descritas son totalmente humanos. En algunas realizaciones, los dominios del HC-SAR derivan totalmente de una especie no humana. En algunas realizaciones, los dominios del HC-SAR son totalmente murinos. En algunas realizaciones, el HC-SAR es una quimera de dominios humanos y dominios no humanos. En algunas realizaciones, el HC-SAR es una quimera de dominios humanos y dominios murinos.

[00354] En una realización, el HC-SAR forma un módulo receptor de células T (TCRM) que es capaz de reclutar al menos un módulo de señalización asociado al TCR cuando se expresa en una célula T.

[00355] En una realización, el HC-SAR forma un TCRM no canónico. Los TCRM no canónicos de ejemplo comprenden módulos que comprenden cadenas de señalización que comprenden dominios transmembrana y/o péptidos de conexión de a) TCR α y TCR γ ; y b) TCR β y TCR δ . Los ejemplos de HC-SAR que forman TCRM no canónicos se proporcionan en SEQ ID NO: 32254-32265, 32268-69, 40142, 40145, 40146-40161. En una realización, el HC-SAR forma una TCRM interespecífica no canónica. Ejemplos de tales HC-SAR que forman TCRM no canónicas se proporcionan en SEQ ID NO: 32266-67.

[00356] En una realización, la cadena constante de TCR que comprende cualquiera de los SAR de la divulgación (*p.ej.*, HC-SAR, SIR, Ab-TCR, zSIR, zCD16-SIR, etc.) comprende una o más de las siguientes características: (i) mutaciones que potencian la dimerización de las cadenas constantes y reducen su emparejamiento con las cadenas de receptores de células T endógenas; (ii) una o ambas cadenas constantes de TCR están optimizadas para codón humano; y/o (iii) las cadenas constantes de TCR son de origen humano, de ratón o de perro.

[00357] En una realización, el dominio de unión a antígeno no-TCR que comprende cualquiera de los SAR de la divulgación (*p.ej.*, HC-SAR, SIR, Ab-TCR, zSIR, zCD16-SIR, etc.) se selecciona del grupo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo seleccionado de entre un Fv, un Fab, y un (Fab')₂; una región variable de cadena pesada de un anticuerpo (dominio vH); una región variable de cadena ligera de un anticuerpo (dominio vL); un fragmento variable de cadena única (scFv); un anticuerpo de dominio único (SDAB); un dominio VHH de camélido; una región variable monomérica de un anticuerpo; un andamiaje de unión a antígeno no inmunoglobulina seleccionado opcionalmente entre un DARPIN, un dominio D (DD), un

afibodina, un afilina, un anectina, un afintina, un obodina, un repebodina, un fynomer, un alfabodina, un avimer, un atrimer, un centyrina, un pronectina, un anticalina, un dominio kunitz, una proteína de repetición Armadillo o un fragmento de unión de los mismos; el dominio extracelular del receptor o un fragmento de unión del mismo; un ligando o un fragmento de unión del mismo; un anticuerpo biespecífico; un autoantígeno; una molécula HLA o un fragmento de la misma, una molécula β 2M o un fragmento de la misma y un complejo HLA/péptido

[00358] En una realización, el SAR de la divulgación, incluyendo HC-SAR y SIR, comprende regiones variables de unas cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo o fragmentos del mismo específicos para un antígeno diana predefinido, de tal manera que, cuando se expresa, una de dichas cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo o fragmentos del mismo se une a una de dichas dos cadenas de dichas cadenas constantes de células T y la otra de dichas cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo o fragmentos del mismo se une a la otra de dichas dos cadenas de dichas cadenas constantes de células T.

[00359] En una realización, cualquiera de los SAR de la divulgación (*p.ej.*, HC-SAR, SIR, Ab-TCR, zSIR, zCD16-SIR, etc.) comprende además uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) o fragmentos de los mismos que están unidos operativamente al N-terminal o cerca del N-terminal de uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR mediante uno o más enlazadores opcionales. En una realización, el AABD está situado N-terminal a uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR.

[00360] En una realización, uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) o fragmentos de los mismos se seleccionan del grupo de: un único dominio vH (SVH) o un fragmento del mismo; un único dominio vL (SVL) o un fragmento del mismo; un dominio vHH o un fragmento del mismo;

un anticuerpo de dominio único o un fragmento del mismo; un TCR de dominio variable único (svd-TCR) o un fragmento del mismo; un andamiaje de unión a antígeno no inmunoglobulina o un fragmento del mismo; un dominio de unión a ligando de un receptor o un fragmento del mismo; un dominio de unión a receptor de un ligando; un autoantígeno o un fragmento del mismo; un dominio de unión a adaptador o un fragmento del mismo; un adaptador o un fragmento del mismo; un epítipo o un fragmento del mismo; y un dominio de unión a Fc o un fragmento del mismo.

[00361] En una realización, el andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina se selecciona del grupo de un DARPIN, un dominio D (DD), un afibodina, un afilina, un anectina, un afintina, un obodina, un repebodina, un fynomer, un alfabodina, un avimer, un atrimer, un centyrina, un pronectina, un anticalina, un dominio kunitz, y una proteína de repetición Armadillo.

[00362] En una realización, el (los) dominio(s) de unión a antígeno no-TCR y/o AABD que comprenden cualquiera de los SAR de la divulgación (*p.ej.*, HC-SAR, SIR, Ab-TCR, zSIR, zCD16-SIR, etc.) se unen a uno o más de los antígenos asociados a enfermedades seleccionados del grupo mostrado en la **Tabla B**.

[00363] En una realización, el (los) dominio(s) de unión a antígeno no-TCR y/o AABD que comprenden cualquiera de los SAR de la divulgación (*p.ej.*, HC-SAR, SIR, Ab-TCR, zSIR, zCD16-SIR, etc.) se enumeran en las **Tablas 3, 5 y 6**.

[00364] En una realización, el (los) dominio(s) de unión a antígeno no-TCR y/o AABD que comprende(n) cualquiera de los SAR de la divulgación (*p.ej.*, HC-SAR, SIR, Ab-TCR, zSIR, zCD16-SIR, etc.) se seleccionan de una o más de las (i) una región variable de cadena ligera (vL) codificada por un polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 339-354, 19766-19776, 32912-33120 y 32006-32068 o secuencias con al menos un 75% de identidad con las mismas en las regiones marco y contiene las regiones determinantes complementarios (CDR) de cualquiera de los polipéptidos anteriores y que codifica un polipéptido que se une a su antígeno y una región variable de cadena pesada complementaria (vH) codificada por un polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO: 363- 378, 19785-19795, 33121-33329, y 32069-32131 o secuencias con al menos un 75% de identidad con las mismas en las regiones marco y que contiene las CDR de cualquiera de los polipéptidos anteriores y que codifica un polipéptido que se une a su antígeno;

(ii) un fragmento variable de cadena única (scFv) codificado por un polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 387-402, 19804-19814, 33330-33538 y 32132-32194 o secuencias con al menos un 75% de identidad con las mismas en las regiones marco y contiene las CDR de cualquiera de los polipéptidos anteriores y que codifica un polipéptido que se une a su antígeno;

(iii) un dominio VHH de camélido codificado por un polinucleótido que tenga una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 412-426, 32195-32213 o secuencias con al menos un 75% de identidad con las mismas en las regiones marco y que contenga las CDR de cualquiera de los polipéptidos anteriores y que codifique un polipéptido que se una a su antígeno;

(iv) un andamiaje no inmunoglobulina codificado por un polinucleótido que tenga una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 435-450 o secuencias con al menos un 75% de identidad con las mismas y que codifique un polipéptido que se una a su antígeno.

(v) un receptor codificado por un polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO 437, 438, 445-448 o secuencias con al menos un 75% de identidad con los mismos y que codifica un polipéptido que se une a su cognado;(vi) un ligando codificado por un

polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 439 o secuencias con al menos 75% de identidad con la misma y que codifica un polipéptido que se une a su cognado; y

(vii) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera (vL) que comprende una o más de las regiones determinantes complementarias de cadena ligera 1-3 (LC-CDR1-3) para un antígeno diana seleccionado según se establece en cualquiera de los SEQ ID NO: 20989-21015, 41591-41861; 21024-21050, 41862-42132; y 21059-21085, 42133-42403 y un polinucleótido que codifica una región variable complementaria de cadena pesada (vH) que comprende una o más de las regiones determinantes complementarias 1-3 de cadena pesada (HC-CDR1-3) para un antígeno diana seleccionado según se establece en cualquiera de los SEQ ID NO: 21094-21120 y 42404-42674; 21129-21155, 42675-42945; y 21164-21190, 42946-43216.

[00365] En una realización, el/los dominio(s) de unión a antígeno no-TCR y/o AABD que comprende(n) cualquiera de los SAR de la divulgación (*p.ej.*, HC-SAR, SIR, Ab-TCR, zSIR, zCD16-SIR, etc.) se selecciona(n) de uno o más de los (i) un dominio variable de cadena ligera (vL) que comprende una secuencia de cualquiera de los SEQ ID Nos: 8719-8734, 20386-20396, 40759-41029 o una secuencia con al menos un 85% de identidad con la misma en la región marco o una secuencia que tenga hasta 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos en la región marco y contenga las CDR de cualquiera de los polipéptidos anteriores y un dominio variable de cadena pesada (vH) complementario que comprenda una secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO: 8743-8758, 20405-20415, 41030-41300 o una secuencia con al menos un 85% de identidad con la misma en la región marco o una secuencia que tenga hasta 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos en la región marco y contenga CDRs de cualquiera de los polipéptidos anteriores, en la que el dominio de unión a antígeno TCR no natural se une a su antígeno;

(ii) un anticuerpo de dominio único, un dominio vHH, un dominio SVH, y/o un dominio FHVH que comprenda una secuencia según se establece en cualquiera de los SEQ ID NO: 8792-8806, 41572-41590, 43217-43318 o una secuencia con al menos un 85% de identidad con la misma en la región marco o una secuencia que tenga hasta 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos en las regiones marco y contenga CDRs de cualquiera de los polipéptidos anteriores y que se una a su antígeno;

(iii) un dominio de unión a antígeno no inmunoglobulina que tenga una secuencia como la establecida en cualquiera de los SEQ ID NO: 43364-43375, 43406-43410 o una secuencia con al menos un 85% de identidad con la misma o una secuencia que tenga hasta 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos y que se una a su antígeno;

- (iv) un dominio scFv que comprende regiones determinantes complementarias de cadena ligera 1-3 (LC-CDR1-3) para un antígeno diana seleccionado según se establece en cualquiera de los SEQ ID NO: 20989-21015, 41591-41861; 21024-21050, 41862-42132; y 21059-21085, 42133-42403 y región variable complementaria de cadena pesada (vH) que comprende una o más de las regiones determinantes complementarias 1-3 de cadena pesada (HC-CDR1-3) para un antígeno diana seleccionado según se establece en cualquiera de los SEQ ID NO: 21094-21120 y 42404-42674; 21129-21155, 42675-42945; y 21164-21190, 42946-43216;
- (v) un fragmento scFv que tenga una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 8767-8782 y 20424-20434, 41301- 41571 o una secuencia con al menos un 85% de identidad con la misma en la región marco o una secuencia que tenga cada una hasta 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos en las regiones marco y contenga CDRs de cualquiera de los polipéptidos anteriores y que se una a su antígeno;
- (vi) uno o más receptores que comprenden secuencias de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 43377-43392 o una secuencia con al menos un 85% de identidad con la misma o una secuencia que tenga hasta 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos;
- (vii) uno o más ligandos que comprenden una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO:43394-43404 o una secuencia con al menos un 85% de identidad con la misma o una secuencia que tenga hasta 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos;
- (viii) un dominio extracelular de CD16A, NKG2D, CD4, PD1, desmogleína 3 (Dsg3)
- (ix) un dominio extracelular de una o más de las cadenas hTPO, mTPO, CGH α , CGH β , FH β , LH β , TSH β , APRIL, o una combinación de las mismas;
- (x) una región variable de cadena ligera (vL) que comprenda una o más de las regiones determinantes complementarias de cadena ligera 1-3 (LC-CDR1-3) para un antígeno diana seleccionado según se establece en cualquiera de los SEQ ID NO: 20989-21015, 41591-41861; 21024-21050, 41862-42132; y 21059-21085, 42133-42403 y una región variable complementaria de cadena pesada (vH) que comprende una o más de las regiones determinantes complementarias de cadena pesada 1-3 (HC-CDR1-3) para un antígeno diana seleccionado según se establece en cualquiera de los SEQ ID NO: 21094-21120 y 42404-42674; 21129-21155, 42675-42945; y 21164-21190, 42946-43216.
- (xi) cualquier combinación de (i)-(x).

[00366] En las **Tablas 2F-2J** se enumeran otras Alternativas HC-SAR adecuadas de acuerdo con algunas realizaciones del presente documento. En algunas realizaciones, el HC-SAR se ajusta a cualquiera de las alternativas enumeradas en las **Tablas 2F-2J**.

[00367] En una realización, la divulgación proporciona un polinucleótido SAR (*p.ej.*, HC-SAR, SIR, Ab-TCR, zSIR, zCD16-SIR, etc.) que codifica para un polipéptido que comprende un dominio

autónomo de unión a antígeno (AABD) o un fragmento del mismo que está unido en el marco al N-terminal o cerca del N-terminal del dominio vL y/o vH del SAR a través de uno o más enlazadores opcionales.

[00368] En algunas realizaciones, la invención proporciona un SAR (*p.ej.*, Receptor de Antígeno Sintético híbrido o un SAR híbrido o HC-SAR) en el que al menos una de las cadenas de TCR comprende un dominio transmembrana que es un híbrido de dos cadenas de TCR diferentes. En una realización, la primera cadena TCR comprende un dominio similar a Ig de cadena TCR β y un péptido de conexión TCR β pero comprende un dominio transmembrana que es un híbrido de cadenas TCR β y TCR γ y comprende además un dominio citosólico TCR γ y la segunda cadena TCR es una cadena constante TCR α (es decir, que comprende un dominio similar a Ig de TCR α , un péptido conector de TCR α , un dominio transmembrana de TCR α y un dominio citosólico de TCR α) o un fragmento funcional o una variante funcional de la misma, incluido el homólogo de una especie no humana. Se proporcionan ejemplos de cadenas híbridas TCR $\beta\gamma$ en SEQ ID NO (DNA): 23228-23229 y SEQ ID NO (PRT): 23674-23675, 32223-32224, 32230-32239. Las cadenas TCR α complementarias de ejemplo se proporcionan en los SEQ ID NO: 453-463, 465-466, 19758, 21199-21224, 22848-22860, 22862-22962, 22974-23019, 23072-23074 y SEQ ID NO (PRT): 8833-8843, 8844-45, 20378, 20378, 21961-21986, 23294-23306, 23307-23408, 23420-23465, 23518-23520, 23558-23560, 23579-23581, 23587-89, 23595-97, 23603-05, 23611-13, 23620-22, 23631-33, 23642-44, 23653-55, 23672-73, 23679, 23681, 27936-27946, 27948-49, 27982-83, 27997, 27999, 28003, 28005, 28149-28194, 28217-28317, 28647-28672, 28686-28843, 28864-66, 29277-29286, 29888-89 y sus variantes funcionales, fragmentos y homólogos. Los ejemplos de SAR con cadenas TCR $\beta\gamma$ híbridas se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 23251-23257, 32254-32258 y SEQ ID NO (PRT): 23697-23703. La cadena hTCRa-T48C-C94S de la construcción anterior puede sustituirse por cualquiera de las cadenas constantes TCR α descritas anteriormente para generar nuevos SAR. Las cadenas TCR en cualquiera de las construcciones anteriores también pueden ser un híbrido de dos especies diferentes. En una realización, una cadena TCR puede comprender el dominio similar a Ig del TCR α humano, un péptido conector del TCR α de ratón y el dominio transmembrana y citosólico del TCR α humano. En otra realización de ejemplo, una cadena TCR puede comprender el dominio similar a Ig del TCR β humano, un péptido de conexión del TCR γ de ratón y un dominio transmembrana del TCR γ humano y un dominio citosólico del TCR γ humano. En una realización, el dominio similar a Ig de una cadena TCR puede derivarse de un anticuerpo. En una realización de ejemplo, una cadena TCR puede comprender el dominio IgCL derivado de un anticuerpo que se une en marco al péptido conector del TCR β , dominio transmembrana del TCR γ y dominio citosólico del TCR γ humano. Ejemplo de dicha cadena de

TCR está representada por SEQ ID NO: 32230-32234 De forma similar, los fragmentos de dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, vL y vH) pueden sustituirse por dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, vL, vH, scFv, andamiajes de unión a antígeno no inmunoglobulina, receptor, ligandos, etc.) dirigidos a diferentes antígenos para generar SAR de una y media cadena o de doble cadena. Además, la cadena [hTCRb-S57C-opt-L447-Ig-ConnP-hTCRg-opt-U427-TMCP] (SEQ ID NO: 23674) se puede sustituirse por hTCRb-S57C-opt-L435-Ig-ConnP-hTCRg-opt-U415-TMCP (SEQ ID NO: 23675) o variantes funcionales, fragmentos u homólogos de especies no humanas.

[00369] En una realización, la primera cadena TCR comprende un dominio similar a Ig de la cadena TCR α y un péptido de conexión TCR α , pero comprende un dominio transmembrana que es un híbrido de las cadenas TCR α y TCR δ y comprende además un dominio citosólico TCR δ y la segunda cadena TCR es una cadena constante TCR β (es decir, que comprende un dominio similar a Ig de TCR β , un péptido conector de TCR β , un dominio transmembrana de TCR β y un dominio citosólico de TCR β) o un fragmento funcional o una variante funcional de la misma, incluido el homólogo de una especie no humana. Se proporcionan ejemplos de cadenas híbridas de TCR $\alpha\delta$ en SEQ ID NO (DNA): 23223-23225, 32240-32249 y SEQ ID NO (PRT): 23669-23671. Las cadenas TCR β complementarias de ejemplo se proporcionan en los SEQ ID NO: 467-487, 19759, 21225-21237, 23228-23229, 23234-23235 y SEQ ID NO (PRT): 8847-8867, 20379, 23674-23675, 23680-23681, 7950-27970, 27980-81, 27984-87, 27998, 28000, 28006, 28008, 28013-28058, 28127-28137, 28318-28444, 28673-28685, 28844-46, 28854-56, 28874-76, 28884-86, 29290-29310. Los ejemplos de SAR con cadenas TCR $\alpha\delta$ híbridas se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 23258-23264, 32259-32263 y SEQ ID NO (PRT): 23704-23710. La cadena [hTCRb-S57C-opt-L447-Ig-ConnP-hTCRg-opt-U427-TMCP] en la construcción anterior puede sustituirse con cualquiera de las cadenas constantes TCR β descritas anteriormente para generar nuevos SAR. Del mismo modo, los fragmentos de dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, vL y vH) pueden sustituirse por dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, vL, vH, scFv, andamiajes de unión a antígeno no inmunoglobulina, receptor, ligandos, etc.) dirigidos a diferentes antígenos para generar SAR de cadena y media o doble cadena. Además, el [hTCRa-T48C-opt-L351-Ig-ConnP-hTCRd-opt-U391-TMCP] (SEQ ID NO: 23669) puede sustituirse por SEQ ID NO: 23670 o 23671 o variantes funcionales, fragmentos u homólogos de especies no humanas.

[00370] En una realización, la primera cadena TCR comprende un dominio similar a Ig de la cadena TCR γ y un péptido de conexión TCR γ pero comprende un dominio transmembrana que es un híbrido de las cadenas TCR γ y TCR β y comprende además un dominio citosólico TCR β y la segunda cadena TCR es una cadena constante TCR δ (es decir, que comprende un dominio

similar a Ig de TCR δ , un péptido conector de TCR δ , un dominio transmembrana de TCR δ y un dominio citosólico de TCR δ) o un fragmento funcional o una variante funcional de la misma, incluido el homólogo de una especie no humana. Se proporcionan ejemplos de cadenas híbridas TCR $\gamma\beta$ en SEQ ID NO (DNA): 23230-23231, 32250-32251 y SEQ ID NO (PRT): 23676-23677. Las cadenas TCR δ complementarias de ejemplo se proporcionan en los SEQ ID NO: 494, 23226-27, 32221 y SEQ ID NO (PRT): 8874, 23672-73.

[00371] En una realización, la primera cadena TCR comprende un dominio similar a Ig de cadena TCR δ y un péptido de conexión TCR δ pero comprende un dominio transmembrana que es un híbrido de las cadenas TCR δ y TCR α y comprende además un dominio citosólico TCR α y la segunda cadena TCR es una cadena constante TCR γ (es decir, que comprende un dominio TCR γ similar a Ig, un péptido conector TCR γ , un dominio transmembrana TCR γ y un dominio citosólico TCR γ) o un fragmento funcional o una variante funcional de la misma, incluido el homólogo de una especie no humana. Se proporcionan ejemplos de cadenas híbridas de TCR $\delta\alpha$ en SEQ ID NO (DNA) 23226-23227, y SEQ ID NO (PRT): 23672-23673. Las cadenas complementarias TCR γ de ejemplo se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 493, 23230-31 y SEQ ID NO (PRT): 8873, 8900-8903, 18351-18372, 18441-18462, 18474-18484, 18713-18813, 23676-77, 28105-28115, 28138-28148, 27975-76, 27977-79, 27988-93, 28002, 28010, 28012, 28195-28216, 28445-28545, 28847-51, 28857-61, 28867-28871, 28877-81, 28887-91, 29315-16 y sus variantes funcionales, fragmentos y homólogos. Los ejemplos de SAR de cadena híbrida se proporcionan en SEQ ID NO: 32268-32269.

[00372] En una realización, la invención proporciona un SAR (*p.ej.*, HC-SAR) que comprende cadenas TCR o fragmentos de las mismas representados por SEQ ID NO: 32223-32253 o variantes funcionales u homólogos que codifican para polipéptidos con al menos 75% (*p.ej.*, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, etc.) de identidad de secuencia con polipéptidos codificados por secuencias SEQ ID NO: 32223-32253.

[00373] En una realización, la invención proporciona un SAR de cadena y media o doble (*p.ej.*, SAR o HC-SAR) que comprende cadenas de TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α seleccionadas de cualquiera de las cadenas o fragmentos de TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ o pre-TCR α proporcionados en el presente documento (*p.ej.*, **Tablas 7 y 22** de la solicitud provisional) o fragmentos funcionales o variantes de los mismos.

[00374] En una realización, la invención proporciona una y media o una doble cadena SAR (*p.ej.*, SIR o HC-SAR, etc.) que comprende una cadena TCR α con secuencias seleccionadas del grupo de SEQ ID NO (DNA): 453-463, 465-466, 19758, 16902-16958, 17003-17103, 21199-21224, 22848-22860, 22862-22962, 22974-23019, 23072-23074 y SEQ ID NO (PRT): 8833-8843, 8844-45, 20378, 20378, 18384-18440, 18485-18585, 21961-21986, 23294-23306, 23307-

23408, 23420-23465, 23518-23520, 23558-23560, 23579-23581, 23587-89, 23595-97, 23603-05, 23611-13, 23620-22, 23631-33, 23642-44, 23653-55, 23672-73, 23679, 23681, 27936-27946, 27948-49, 27982-83, 27997, 27999, 28003, 28005, 28149-28194, 28217-28317, 28647-28672, 28686-28843, 28864-66, 29277-29286, 29888-89, 32218-32219 o una variante funcional, fragmento u homólogo que codifique para polipéptidos con al menos el 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%,85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100%) identidad de secuencia con los polipéptidos codificados por las secuencias anteriores.

[00375] En una realización, la invención proporciona un SAR de cadena y media o doble (*p.ej.*, SIR o HC-SAR, etc.) que comprende una cadena TCR α con una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO (PRT): 31963, 31969, 31971, 31973, 31975, 31977, 31979, 31981, 31983 o una variante funcional, fragmento u homólogo que codifica para polipéptidos con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%,85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con el mismo.

[00376] En una realización, la invención proporciona una y media o una doble cadena SAR (*p.ej.*, SIR o HC-SAR, etc.) que comprende una cadena TCR β con una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO (PRT): 31964, 31965-31968, 31970, 31972, 31974, 31976, 31978, 31980, 31982 y 31984 o una variante funcional, fragmento u homólogo que codifica para polipéptidos con al menos 70% (*p. ej.*, 70%, 75%, 80%,85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con los mismos.

[00377] En una realización, la invención proporciona un SAR de cadena y media o doble (*p. ej.*, SIR o HC-SAR, etc.) que comprende una cadena TCR β con secuencias seleccionadas del grupo de SEQ ID NO (DNA):467-487, 16777-16822, 16891-16901, 17104-17230, 21225-21237, 23228-23229, 23234-23235 y SEQ ID NO (PRT): 8847-8867, 18259-18304, 18373-18383, 18586-18712, 23674-23675, 23680-23681, 7950-27970, 27980-81, 27984-87, 27998, 28000, 28006, 28008, 28013-28058, 28127-28137, 28318-28444, 28673-28685, 28844-46, 28854-56, 28874-76, 28884-86, 29290-29310, y 32220 o una variante funcional, fragmento u homólogo de los mismos con al menos un 70% (*e.g.*, 70%, 75%, 80%,85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con los mismos.

[00378] En una realización, la invención proporciona un SAR de cadena y media o doble (*p.ej.*, SIR o HC-SAR, etc.) que comprende una cadena TCR γ con secuencias seleccionadas del grupo de SEQ ID NO (DNA): 493, 17231-17331, 16869-16879, 16959-16980, 16992-17002, 23230-31 y SEQ ID NO (PRT): 8900-8903, 18351-18372, 18441-18462, 18474-18484, 18713-18813, 23676-77, 28105-28115, 28138-28148, 27975-76, 27977-79, 27988-93, 28002, 28010, 28012, 28195-28216, 28445-28545, 28847-51, 28857-61, 28867-28871, 28877-81, 28887-91, 29315-16 y 32222 o una variante funcional, fragmento u homólogo que codifique para

polipéptidos con al menos el 70% (e.g., 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con los polipéptidos codificados por las secuencias anteriores.

[00379] En una realización, la invención proporciona un SAR de cadena y media o doble (*p.ej.*, SIR o HC-SAR, etc.) que comprende una cadena TCR δ con secuencias seleccionadas del grupo de SEQ ID NO (DNA): 495, 16823-16868, 16880-16890, 16981-16991, 17332-17432, 23226-27 y SEQ ID NO (PRT): 8875, 18305-18350, 18362-18372, 18463-18473, 18814-18914, 23672-73, 32221 o una variante funcional, fragmento u homólogo que codifica para polipéptidos con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100%) identidad de secuencia con los polipéptidos codificados por las secuencias anteriores.

[00380] La divulgación proporciona un SAR de cadena y media o doble (*p.ej.*, SIR o HC-SAR, etc.) que comprende un dominio de unión a antígeno (*p.ej.*, scFv, vHH, FHVH, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, receptor, ligando, adaptador, etiqueta de epítipo, autoantígeno, etc.) que se une operativamente a una cadena constante de TCR híbrido o variante de la misma y se coexpresa con una cadena constante de TCR híbrido complementaria o variante de la misma. En una realización, el dominio de unión a antígeno de SAR (*p.ej.*, SIR) es un dominio de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, vL, vH, anticuerpo de dominio único, scFv, vHH, FHVH, SVH, SVL, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, receptor, ligando, adaptador, etiqueta de epítipo, autoantígeno, etc.). Un dominio de unión a antígeno no-TCR es un dominio de unión a antígeno que es estructuralmente distinto de un TCR que se encuentra en la naturaleza. En una realización de ejemplo, un dominio de unión a antígeno no-TCR carece de los dominios variables de un TCR, *p.ej.*, los dominios V α , V β , V γ y/o V δ . Las cadenas constantes de TCR híbrido de ejemplo se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 529-544 y SEQ ID NO (PRT): 8909-8924, 22112-22576, 23420-23677, 27936-31955. La divulgación también proporciona un SAR que comprenden cadenas constantes TCR híbridas con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con cadenas TCR híbridas proporcionadas en SEQ ID NO (PRT): 8909-8924, 22112-22576, 23420-23677, 27936-31955 y variantes funcionales y mutantes de las mismas, incluyendo homólogos de especies no humanas. En SEQ ID NO (DNA): se proporcionan ejemplos de SAR de una cadena y media (OHC) (*p.ej.*, SIR) que comprenden cadenas constantes TCR híbridas y dominios de unión a antígeno no-TCR dirigidos a diversos antígenos: 8106-8393 y SEQ ID NO (PRT): 16487-16774 (véanse también las Tablas 19 y 20 de la solicitud provisional). En una realización, el SAR OHC (*p.ej.*, SIR) comprende además uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) que están operativamente unidos al N-terminal o cerca del N-terminal de los dominios de unión a antígeno no-TCR mediante uno o más enlazadores opcionales.

[00381] En una realización, una cadena de TCR α que comprende un SAR (*p.ej.*, SIR o HC-SAR, etc.) es una cadena que comprende el dominio transmembrana de TCR α representado por SEQ ID NO (PRT): 9005 o 31985 u homólogos o variantes funcionales del mismo, incluidos homólogos de especies no humanas. En una realización, una cadena TCR α que comprende un SAR es una cadena que comprende un dominio transmembrana con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 9005. En una realización, una cadena de TCR α que comprende un SIR es una cadena que comprende el péptido conector (o dominio bisagra) de TCR α (SEQ ID NO (PRT): 8995-6) u homólogos o variantes funcionales del mismo con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con el mismo, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, una cadena de TCR α que comprende un SIR es una cadena que comprende el péptido conector (o dominio bisagra) y dominios transmembrana de TCR α o variantes funcionales de los mismos, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, el SAR comprende una cadena de TCR que comprende la secuencia con SEQ ID NO: 40606-40638. En una realización, la invención proporciona un SAR que comprende una cadena TCR que comprende la secuencia con SEQ ID NO: 31985. En una realización, una cadena TCR δ que comprende un SAR es una cadena con la secuencia -LSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWS- (SEQ ID NO: 40606) o una variante funcional o un homólogo con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos excepto los residuos en las posiciones 7, 12, 17 y 21 son Y, K, Y y T, respectivamente. En una realización, una cadena TCR α que comprende un SAR es una cadena que comprende un fragmento de TCR α (SEQ ID NO: 8834) y es capaz de dimerizar con una cadena TCR β o fragmento de la misma.

[00382] En una realización, una cadena pre-TCR α que comprende un SAR es una cadena que comprende el dominio transmembrana del pre-TCR α u homólogos o variantes funcionales del mismo, incluidos homólogos de especies no humanas. En una realización, una cadena pre-TCR α que comprende un SAR es una cadena que comprende un dominio transmembrana con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 40737. En una realización, una cadena TCR α que comprende un SAR es una cadena que comprende el péptido conector (o dominio bisagra) de pre-TCR α u homólogos o variantes funcionales del mismo con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con el mismo, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, una cadena TCR α que comprende un SAR es una cadena que comprende el péptido conector (o dominio bisagra) y dominios transmembrana de pre-TCR α o variantes funcionales de los mismos, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, el SAR comprende una cadena TCR que comprende la secuencia con SEQ ID NO:

40737-40758. En una realización, la invención proporciona un SAR que comprende una cadena TCR que comprende la secuencia con SEQ ID NO: 31992. En una realización, una cadena TCR δ que comprende un SAR es una cadena con la secuencia -

LWLGVLRLLLLFKLLFDLLLTCSCSL- (SEQ ID NO: 40737) o una variante funcional o un homólogo con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos excepto los residuos en las posiciones 7, 12, 17 y 21 son Y, K, Y y T, respectivamente. En una realización, una cadena pre-TCR α que comprende un SAR es una cadena que comprende un fragmento de pre-TCR α (SEQ ID NO:8871) y es capaz de dimerizar con una cadena TCR β o fragmento de la misma.

[00383] En una realización, una cadena de TCR β que comprende un SAR es una cadena que comprende el dominio transmembrana de TCR β (SEQ ID NO (PRT): 9006) u homólogos o variantes funcionales del mismo, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, una cadena de TCR α que comprende un SAR es una cadena que comprende un dominio transmembrana con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 9006. En una realización, una cadena de TCR β es una cadena que comprende el péptido conector (o dominio bisagra) de TCR β (SEQ ID NO (PRT): 8997-8) u homólogos o variantes funcionales del mismo con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con el mismo, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, una cadena TCR β es una cadena que comprende el péptido conector (o dominio bisagra) y dominios transmembrana de TCR β o variantes funcionales de los mismos. En una realización, una cadena TCR β es una cadena que comprende un fragmento de TCR β (SEQ ID NO: 8847-48) y es capaz de dimerizar con una cadena TCR α o fragmento de la misma. En una realización, la invención proporciona un SAR que comprende una cadena TCR que comprende la secuencia con SEQ ID NO: 31986. En una realización, un TCR β que comprende un SAR es una cadena con la secuencia SATILYEILLGKATLYAVLVSAVLVM (SEQ ID NO: 40671) o una variante funcional o un homólogo con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos excepto que los residuos en las posiciones 6, 12 y 16 son Y, K e Y, respectivamente.

[00384] En una realización, una cadena de TCR γ que comprende un SAR es una cadena que comprende el dominio transmembrana de TCR γ (SEQ ID NO (PRT): 9007) u homólogos o variantes funcionales del mismo con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 9007. En una realización, una cadena TCR γ es una cadena que comprende el péptido conector (o dominio bisagra) de TCR γ (SEQ ID NO (PRT): 8999-9000) u homólogos o variantes funcionales del mismo con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8999-9000. En una realización, una cadena TCR γ es una cadena que

comprende el péptido conector (o dominio bisagra) y dominios transmembrana de TCR γ o variantes funcionales de los mismos. En una realización, una cadena TCR γ es una cadena que comprende un fragmento de TCR γ (SEQ ID NO: 8872-73) y es capaz de dimerizar con una cadena TCR δ o fragmento de la misma. En una realización, la invención proporciona un SAR que comprende una cadena TCR que comprende la secuencia con SEQ ID NO:31987. En una realización, una cadena TCR γ que comprende un SAR es una cadena con la secuencia - SAYYMYLLLKSVVYFAITCCLLR- (SEQ ID NO: 40709) o una variante funcional o un homólogo con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos excepto los residuos en las posiciones 6, 12 y 16 son Y, K e Y, respectivamente.

[00385] En una realización, una cadena de TCR δ que comprende un SAR es una cadena que comprende el dominio transmembrana de TCR δ (SEQ ID NO (PRT): 9008) u homólogos o variantes funcionales del mismo con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 9008. En una realización, una cadena TCR δ es una cadena que comprende el péptido conector (o dominio bisagra) de TCR δ (SEQ ID NO (PRT): 9001-2) u homólogos o variantes funcionales del mismo. En una realización, una cadena de TCR δ es una cadena que comprende el péptido conector (o dominio bisagra) y dominios transmembrana de TCR δ o variantes funcionales de los mismos con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%) de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 9001-2. En una realización, una cadena TCR δ es una cadena que comprende un fragmento de TCR δ (SEQ ID NO: 8874-75) y es capaz de dimerizar con una cadena TCR γ o fragmento de la misma. En una realización, la invención proporciona un SAR que comprende una cadena TCR que comprende la secuencia con SEQ ID NO:31988. En una realización, una cadena TCR δ que comprende un SAR es una cadena con la secuencia LTVLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFF (SEQ ID NO: 40639) o una variante funcional o un homólogo con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, excepto que los residuos en las posiciones 7, 12, 17 y 21 son Y, K, Y y T, respectivamente.

[00386] Varias disposiciones de ácido nucleico que codifican la primera y segunda cadenas híbridas son adecuadas de acuerdo con algunas realizaciones del presente documento

[00387] En algunas realizaciones, un primer ácido nucleico codifica la primera cadena híbrida que comprende el dominio constante de la cadena alfa combinado con el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena beta, y recíprocamente, un segundo ácido nucleico codifica la segunda cadena híbrida que comprende el dominio constante de la cadena beta combinado con el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena alfa.

[00388] En algunas realizaciones, un primer ácido nucleico codifica la primera cadena híbrida que comprende el dominio constante y el péptido conector de la cadena alfa combinados con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena beta, y recíprocamente, un segundo ácido nucleico codifica la segunda cadena híbrida que comprende el dominio constante y el péptido conector de la cadena beta combinados con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena alfa.

[00389] En algunas realizaciones, un primer ácido nucleico codifica la primera cadena híbrida que comprende el dominio constante de la cadena gamma combinado con el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena delta, y recíprocamente, un segundo ácido nucleico codifica la segunda cadena híbrida que comprende el dominio constante de la cadena delta combinado con el péptido conector, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena gamma.

[00390] En algunas realizaciones, un primer ácido nucleico codifica la primera cadena híbrida que comprende el dominio constante y el péptido conector de la cadena gamma combinados con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena delta, y recíprocamente, un segundo ácido nucleico codifica la segunda cadena híbrida que comprende el dominio constante y el péptido conector de la cadena delta combinados con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la cadena gamma.

[00391] En algunas realizaciones, los diferentes dominios de un SAR están unidos por uno o más enlazadores. En una realización de ejemplo, el dominio de unión a antígeno no-TCR y los dominios constantes TCR de un SAR (*p.ej.*, SIR, HC-SIR, zSIR, uSAR-TCR, zCD16-SAR, etc.) están unidos por un enlazador. En una realización, el enlazador es un enlazador peptídico corto. En una realización, el enlazador es de cualquier longitud. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 2 y 50 aminoácidos o de entre 5 y 100 aminoácidos.

[00392] En algunas realizaciones, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico forman parte de la misma construcción (*p.ej.*, un vector). Opcionalmente, el primer y el segundo ácido nucleico pueden estar bajo el control de diferentes promotores. Opcionalmente, el primer y el segundo ácido nucleico pueden estar bajo el control del mismo promotor. En una realización, al menos uno de los ácidos nucleicos está bajo el control de un promotor dirigido por un receptor SynNotch. Opcionalmente, el primer y el segundo ácido nucleico pueden estar separados por una secuencia polinucleotídica codificante del polipéptido 2A.

[00393] Un número de promotores son adecuados para conducir la expresión del primer y/o segundo ácido nucleico de acuerdo con algunas realizaciones del presente documento. El promotor puede ser natural o no natural. Ejemplos de promotores incluyen, pero no se limitan a, promotores virales, promotores de plantas y promotores de mamíferos. Ejemplos de promotores

virales incluyen, pero no se limitan a, el promotor MND3 (SEQ ID NO: 25-26) y el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV). En algunas realizaciones, puede usarse un promotor específico del tipo de célula (*p.ej.*, CD4 vs CD8 vs Treg), dependiendo del tipo de célula que vaya a modificarse genéticamente. En algunas realizaciones, puede usarse un promotor promiscuo.

[00394] En algunas realizaciones, el SAR (*p.ej.*, HC-SAR) se dirige a un locus génico endógeno de células T (*p.ej.*, TRAC, TRBC, TRDC, TRGC, etc.). En algunas realizaciones, el SAR (*p.ej.*, HC-SAR) se expresa bajo el promotor de un gen TCR endógeno (*p.ej.*, TRAC, TRBC, TRDC, TRGC). Las construcciones de ejemplo para dirigir un SAR (*p.ej.*, HC-SAR) al locus TRAC se proporcionan en SEQ ID NO: 8396-8404. En una realización, el SAR (*p. ej.*, HC-SAR) se dirige a un locus endógeno utilizando un sistema de orientación génica conocido en la técnica, como CRISP/Cas9, ARCUS, nucleasas de dedo Zn, etc.

[00395] En una realización, la expresión de una o ambas cadenas de un SAR y/o módulos accesorios y/o controles terapéuticos está bajo el control transcripcional de un polipéptido receptor de muesca sintético (SynNotch) que comprende desde la región N a la C-terminal: un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio de núcleo Notch que comprende uno o más sitios de escisión proteolítica, y un dominio intracelular que comprende un activador transcripcional que comprende un dominio de unión a ADN y un dominio de transactivación, en el que la unión del dominio de unión a antígeno extracelular a un antígeno diana (*e.g.*, CD19, MSLN, etc.) induce la escisión del dominio central Notch en uno o más sitios de escisión proteolítica, liberando así el dominio intracelular y el regulador transcripcional. En algunas realizaciones, el regulador transcripcional es un activador transcripcional.

[00396] En algunas realizaciones, la divulgación proporciona vectores que expresan el SAR (*p.ej.*, HC-SAR). En una realización, el vector SAR se selecciona del grupo que consiste en un vector de ADN, un vector de ARN, un plásmido, un vector lentivirus, un vector adenoviral, un vector retrovirus, un vector baculovirus, un vector transposón sleeping beauty y un vector transposón Piggy BAC.

[00397] En algunas realizaciones, un vector proporcionado en el presente documento incluye un gen para un marcador seleccionable que es eficaz en una célula eucariota. Los genes marcadores seleccionables típicos codifican proteínas que confieren resistencia a un antibiótico o toxina (*p.ej.*, neomicina, metotrexato, gentamicina, zeocina) o deficiencias auxotróficas del complemento.

[00398] En algunas realizaciones, el SAR (*p.ej.*, HC-SAR) se expresa en una célula T CD4. En algunas realizaciones, el HC-SAR se expresa en una célula T CD8. En una realización, el SAR (*p.ej.*, HC-SAR) de la invención se coexpresa con un control terapéutico y/o un módulo

accesorio. En una realización, los módulos accesorios y los controles terapéuticos se expresan usando el mismo vector que el SAR (*p.ej.*, HC-SAR) o a partir de un vector separado.

[00399] Según la presente invención, las células inmunorreceptoras modificadas que expresan o presentan un SAR (*p. ej.*, uTCR-SAR, SIR, HC-SAR, zSIR, zCD16-SAR, etc.) pueden expresar o presentar además un coreceptor heterólogo (*p. ej.*, la célula se transduce con una secuencia de ácido nucleico que codifica un coreceptor, o se manipula para que comprenda dicha secuencia, *p.ej.* mediante golpe genético). El coreceptor heterólogo puede ser un coreceptor CD8 y/o un coreceptor CD4. El coreceptor CD8 puede comprender un dímero o par de cadenas CD8 que comprenda una cadena CD8- α y CD8- β o una cadena CD8- α y CD8- α . Preferiblemente, el coreceptor CD8 es un coreceptor CD8 $\alpha\alpha$ que comprende una cadena CD8- α y CD8- α . Un coreceptor CD8 α puede comprender la secuencia de aminoácidos de al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 9025, SEQ ID NO: 9025 o una variante de la misma. Un coreceptor CD8 β puede comprender la secuencia de aminoácidos de al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 9024, SEQ ID NO: 9024 o una variante de la misma. El coreceptor CD8 α puede ser un homodímero. Preferiblemente, las células inmunoreceptoras modificadas que expresan o presentan un SAR heterólogo (*p. ej.*, uTCR-SAR, SIR, zSIR, etc.) pueden expresar o presentar además un coreceptor heterólogo (*p. ej.*, la célula se transduce con o se manipula para que comprenda una secuencia de ácido nucleico que codifica un coreceptor, *p.ej.* mediante golpe genético) que es un coreceptor CD8 como se define en el presente documento.

[00400] El coreceptor CD8 puede comprender la secuencia de aminoácidos de referencia de SEQ ID NO: 9024-9025 o puede ser una variante de la misma. El coreceptor CD8 puede estar codificado por la secuencia nucleotídica de referencia SEQ ID NO: 644-645 o puede ser una variante de la misma. De acuerdo con la invención, el coreceptor heterólogo puede comprender un coreceptor CD8 en el que, en el dominio de tipo V similar a Ig, comprende CDR que tienen la secuencia que comprende; (i) aminoácidos 45-53 de SEQ ID NO: 9025, (ii) aminoácidos 72-79 de SEQ ID NO: 9025, (iii) aminoácidos 80-117 de SEQ ID NO: 9025, o secuencias que tienen al menos un 70% de identidad de secuencia con las mismas.

[00401] De acuerdo con la invención, el coreceptor CD8 heterólogo puede comprender un coreceptor CD8 que comprende o en el que, en el dominio de tipo V similar a Ig, comprende los residuos 22-135 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 9025, o una secuencia de aminoácidos en la que los residuos de aminoácidos 22-44, 54-71, 80-117, 124-135 de la misma tienen al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la secuencia de residuos de aminoácidos 22-44, 54-71, 80-117, 124-135, CDR 1, CDR 2, CDR 3, respectivamente de SEQ ID NO: 9025 y en la que los residuos de aminoácidos 45-53, 72-79 y 118-123 tienen al menos

70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la secuencia de residuos de aminoácidos 45-53, 72-79 y 118-123 respectivamente de SEQ ID NO: 9025.

[00402] De acuerdo con la invención, el coreceptor CD8 puede comprender un coreceptor CD8 en el que, o en el que en el dominio de tipo V similar a Ig, la secuencia de: (i) residuos de aminoácidos 22-44 del mismo puede tener (a) al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la secuencia de residuos de aminoácidos 22-44 de SEQ ID NO: 9025 o (b) puede tener uno, dos o tres residuos de aminoácidos insertados o eliminados en relación con los residuos 22-44 de SEQ ID NO: 9025, (ii) los residuos de aminoácidos 45-53 son los aminoácidos 45-53 de SEQ ID NO: 9025, (iii) los residuos de aminoácidos 54-71 pueden tener (a) al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la secuencia de residuos de aminoácidos 54-71 de SEQ ID NO: 9025 o (b) pueden tener uno, dos o tres residuos de aminoácidos insertados o eliminados en relación con la secuencia de residuos de aminoácidos 54-71 de SEQ ID NO: 9025, (iv) los residuos de aminoácidos 72-79 pueden ser los aminoácidos 72-79 de SEQ ID NO: 9025, (v) los residuos de aminoácidos 80-117 de la misma pueden tener al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la secuencia de residuos de aminoácidos 80-117 de SEQ ID NO: 9025 o pueden tener una, dos o tres inserciones, deleciones o sustituciones relativas a la secuencia de residuos de aminoácidos 80-117 de SEQ ID NO: 9025; (vi) los aminoácidos 118-123 pueden ser aminoácidos 80-117 de SEQ ID NO: 9025, (vii) los residuos de aminoácidos 124-135 de la misma pueden tener al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con la secuencia de residuos de aminoácidos 124-135 de SEQ ID NO: 9025 o pueden tener una, dos o tres inserciones, deleciones o sustituciones relativas a la secuencia de residuos de aminoácidos 124-135 de SEQ ID NO: 9025.

[00403] Según la invención, el coreceptor CD4 puede comprender la secuencia de aminoácidos de referencia de SEQ ID NO: 9026 o puede ser una variante de la misma. El coreceptor CD4 puede estar codificado por la secuencia nucleotídica de referencia SEQ ID NO: 646 o puede ser una variante de la misma.

[00404] Las células inmunoreceptoras modificadas (*p.ej.*, células T, NK, monocitos, etc.) que expresan el coreceptor CD8 y/o CD4 heterólogo pueden demostrar una afinidad y/o aidez y/o activación celular mejorada, según lo determinable por los ensayos aquí divulgados, hacia o en la estimulación por péptido antigénico, tumor o antígeno canceroso opcionalmente cuando se presenta en HLA.

[00405] La divulgación también proporciona células inmunorresponsables que expresan un módulo accesorio que comprende IL12, proteína de fusión de IL12 o una variante de la misma que puede coexpresarse con los SAR (*p.ej.*, uTCR-SAR, SIR, HC-SAR, zCD16-SAR, etc.) de la divulgación. En la **Tabla 25** de la solicitud de patente provisional (SEQ ID NO (DNA): 968-969

y SEQ ID NO (PRT): 9348-9349). Los SAR de ejemplo (*p.ej.*, uTCR-SAR) que comprenden IL12f e IL12f-CD28-Hinge-TM también se proporcionan en la **Tabla 25** de la solicitud de patente provisional (SEQ ID NO: 967, 970-980; y SEQ ID NO (PRT): 9347, 9350-9360). La divulgación proporciona células inmunorresponsables que expresan un SAR y un módulo accesorio que comprende proteínas de fusión IL12 e IL12 que tienen al menos un 80% de identidad con las proteínas de fusión IL12 e IL12 (*p.ej.*, IL12f e IL12f-CD28-Hinge-TM) proporcionadas en SEQ ID NO (DNA) 968-969 y SEQ ID NO (PRT): 9348-9349. En una realización, una célula inmunorresistente que expresa un SAR y una proteína de fusión IL12 o IL12f muestra una mayor sensibilidad a una célula que expresa un antígeno diana en comparación con una célula inmunorresistente que expresa un SAR sin una proteína de fusión IL12 o IL12f.

[00406] De acuerdo con la invención, las células inmunorreactivas modificadas (*p.ej.*, T, NK, monocitos, macrófagos, etc.) pueden tener una expresión mejorada o aumentada de CD40L, producción de citocinas, actividad citotóxica, inducción de la maduración de células dendríticas o inducción de la producción de citocinas de células dendríticas, opcionalmente en respuesta al cáncer y/o antígeno tumoral o antígeno peptídico del mismo opcionalmente tal como se presenta por tumor de célula o tejido canceroso, en comparación con células inmunorreceptoras que carecen del coreceptor heterólogo CD8 o CD4.

[00407] En una realización, la divulgación también proporciona polipéptidos codificados por cualquiera de los polinucleótidos SAR (*p.ej.*, HC-SAR) descritos en el presente documento.

[00408] De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan métodos para fabricar células T que expresen HC-SAR. Los SAR, incluyendo HC-SAR, SAR y Ab-TCR, de la divulgación también pueden expresarse en células distintas de las células T (*p.ej.*, NK, macrófagos, etc.) que han sido diseñadas para expresar exógenamente una o más de las cadenas CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ y CD3 ζ . En una realización, células distintas de las células T (*p.ej.*, NK, macrófagos, etc.) han sido modificadas para expresar exógenamente las cadenas CD3 ϵ , CD3 γ , y CD3 δ . En una realización, células distintas de las células T (*p.ej.*, NK) han sido modificadas para expresar las cadenas CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ y CD3 ζ .

[00409] En una realización, se describe un método *ex vivo* o *in vivo* para fabricar una célula efectora inmunitaria (*p.ej.*, T, NK, NKT, célula madre, etc.) que exprese SAR (*p.ej.*, HC-SAR). En una realización, el método comprende introducir un vector que codifica un polinucleótido recombinante de la reivindicación 1 en una célula efectora inmunitaria o una célula madre hematopoyética o célula progenitora que pueda dar lugar a una célula efectora inmunitaria, en condiciones tales que se exprese el polipéptido HC-SAR. En una realización, el método comprende introducir ARN o ARN transcritos *in vitro* o ARN o ARN sintéticos en una célula o

población de células, donde el ARN o ARN comprende un polinucleótido o polinucleótidos recombinantes que codifican el SAR (*p.ej.*, HC-SAR) y/o cualquier módulo accesorio o control terapéutico.

[00410] Las células T pueden aislarse de un sujeto o de un donante. Opcionalmente, las células T pueden proceder de una línea celular. Las células T pueden modificarse genéticamente para que expresen un HC-SAR. Las células T pueden modificarse genéticamente utilizando cualquiera de los enfoques conocidos por el experto en la materia. Las células T pueden ponerse en contacto con/transfectarse con un vector de expresión o colección de vectores de expresión que codifican un HC-SAR como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, dos vectores de expresión, un vector que codifica una primera cadena de un HC-SAR y un vector que codifica una segunda cadena de un HC-SAR, se ponen en contacto con las células T aisladas. En algunas realizaciones, el vector de expresión lleva tanto el primer como el segundo ácido nucleico y, por lo tanto, sólo se pone en contacto un vector de expresión con las células T aisladas. Los vectores expresan HC-SAR de acuerdo con cualquiera de las configuraciones de HC-SAR.

[00411] Opcionalmente, tras el contacto con un único vector o dos vectores, se coloca una célula T en un medio de cultivo selectivo. En algunas realizaciones, el vector comprende un gen marcador seleccionable que codifica una proteína que confiere resistencia a un antibiótico o toxina presente en el medio de cultivo selectivo. Opcionalmente, el gen marcador seleccionable codifica una proteína que complementa una deficiencia auxotrófica y permite a la célula T sobrevivir en un medio de cultivo selectivo. Opcionalmente, puede realizarse un paso de selección en el que las células T contactadas con/transfectadas con un vector de expresión de HC-SAR se clasifican mediante citometría de flujo para seleccionar las células T que expresan HC-SAR y separarlas de las células T que no expresan HC-SAR. Opcionalmente, la clasificación por citometría de flujo se utiliza para seleccionar las células T que expresan niveles relativamente altos de HC-SAR. Opcionalmente, la expresión del TCR endógeno se anula o elimina en la célula T transfectada. Opcionalmente, el efecto del knockdown o eliminación del TCR endógeno se mide, *p.ej.*, determinando los niveles de ARN mensajero y/o los niveles polipeptídicos del TCR endógeno.

[00412] En algunas realizaciones, la expresión de un TCR endógeno se reprime o elimina antes de la clasificación por citometría de flujo de la célula T que expresa HC-SAR y antes de administrar una célula T que expresa HC-SAR a un sujeto.

[00413] Opcionalmente, las células T modificadas genéticamente se utilizan posteriormente, *p.ej.*, para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto con un cáncer o una enfermedad infecciosa. Opcionalmente, las células T modificadas genéticamente se conservan para su uso

posterior, *p.ej.*, se conservan criogénicamente. Por ejemplo, las células T alogénicas pueden conservarse en un banco para su uso posterior en un sujeto adecuado.

[00414] En algunas realizaciones, la célula T modificada genéticamente comprende un primer ácido nucleico que codifica la primera cadena híbrida y un segundo ácido nucleico que codifica la segunda cadena híbrida de cualquiera de los SAR. En algunas realizaciones, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico codifican la primera cadena híbrida y la segunda cadena híbrida de cualquiera de los SAR.

[00415] En algunas realizaciones, la célula tiene una o más de las siguientes modificaciones genéticas y/o características: a) carece de expresión de un TCR endógeno funcional en su superficie; b) tiene expresión disminuida de un TCR endógeno funcional en su superficie; c) carece de expresión o tiene expresión disminuida de una o más subunidades que comprenden un TCR endógeno funcional; d) carece de la expresión o tiene una expresión disminuida de una o más cadenas de TCR seleccionadas del grupo de TCR α , TCR β 1, TCR β 2, TCR γ , TCR δ y pre-TCR α ; e) expresa un TCR endógeno sustancialmente deficiente; f) es deficiente en la expresión de uno o más antígenos diana del SAR (e.g., HC-SAR; g) tiene una delección o mutación en uno o más antígenos diana del SAR (*p.ej.*, HC-SAR a una forma que ya no es reconocida por el SAR (*p.ej.*, HC-SAR; h) carece de la expresión o tiene una baja expresión de un HLA funcional; i) carece de la expresión de β 2 microglobulina; j) carece de la expresión de diacylglicerol quinasa (DGK) o Ikaros; k) expresa un agente que mejora la actividad de SAR (*p.ej.*, HC-SAR); l) expresa un agente que inhibe una molécula inhibidora; m) expresa un agente que inhibe la expresión de uno o más antígenos diana de SAR; n) expresa un agente que proporciona coestimulación a una célula que expresa SAR; o) expresa una citoquina o una quimioquina; p) expresa un agente que promueve la proliferación, persistencia, expansión y activación de una célula que expresa SAR (*p. ej.*, HC-SAR), HC-SAR); q) expresa un receptor soluble; r) expresa un segundo SAR (*p. ej.*, HC-SAR; s) expresa un receptor quimérico de antígeno (CAR); t) expresa un CAR inhibidor que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula inhibidora; u) expresa un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio primario de señalización; v) expresa un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, un dominio de señalización coestimulador pero ningún dominio de señalización primario; w) expresa un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, un dominio de señalización primario y un dominio coestimulador; x) expresa un coreceptor, en el que el coreceptor es CD8a, CD8b, CD4 o una combinación o variante de los mismos; y) expresa IL12 o una variante de la misma; z) expresa formas solubles o ancladas a la membrana de IL2 o IL15; ab) expresa un módulo accesorio seleccionado del grupo de 41BBL,

CD40L, CD80, CD86, K13, MC159, cFLIP-L/MRIT α , cFLIP-p22, HTLV1 Tax, HTLV2 Tax, HTLV2 Tax-RS mutante, FKBPx2-K13, FKBPx2-HTLV2-Tax, FKBPx2-HTLV2-Tax-RS, IL6R-304-vHH-Alb8-vHH, IL12f, PD1-4H1 scFV, PD1-5C4 scFV, PD1-4H1-Alb8-vHH, PD1-5C4-Alb8-vHH, CTLA4-Ipilimumab-scFv, CTLA4-Ipilimumab-Alb8-vHH, IL6-19A-scFV, IL6-19A-scFV-Alb8-vHH, sHVEM, sHVEM-Alb8-vHH, hTERT, Fx06, CD3z, CD3z-GGGS-41BB, CD3-BBz, CD3-CD28z, proteína de fusión CD3-CD28-Lck, ARNhc dirigido a Brd4, hTERT, heparinasa, citocina, quimiocina, IL2, IL-7, IL-15, IL12f, IL-21, un agente coestimulador, un receptor soluble o una combinación de los mismos; y) expresa un control terapéutico y/o ac) expresa un control terapéutico seleccionado del grupo de un receptor truncado del factor de crecimiento epidérmico (tEGFR), receptor viii truncado del factor de crecimiento epidérmico (tEGFRviii), CD30 truncado (tCD30), BCMA truncado (tBCMA), CD19 truncado (tCD19), CD34, timidina quinasa, citosina deaminasa, nitrorreductasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, caspasa 8 humana, caspasa 9 humana, caspasa 9 inducible (icaspasa9), purina nucleósido fosforilasa, linamarasa/linamarina/glucosa oxidasa, desoxirribonucleósido quinasa, peroxidasa de rábano picante (HRP)/indol-3-acético (IAA), gamma-glutamylcisteína sintetasa, CD20/alfaCD20, quimera CD34/timidina quinasa, caspasa-2 dependiente de dox, timidina quinasa mutante (HSV-TKSR39), sistema AP1903/Fas, un receptor quimérico de citoquinas (CCR), un marcador de selección, receptor de dihidroxifolato (DHFR), DHFR mutante, metilado-ADN-proteína-cisteína metiltransferasa, inosina monofosfato deshidrogenasa II (IMDHP2), puromicina acetiltransferasa (PAC), gen de resistencia a la blasticidina, calcineurina a/b mutante (Can/b), CNa12, CNb30, un gen suicida y combinaciones de los mismos.

[00416] En algunas realizaciones, una célula T CD4 comprende cualquiera de las configuraciones HC-SAR de las **Tablas 2F-2J**. En algunas realizaciones, una célula T CD8 comprende cualquiera de las configuraciones HC-SAR de las **Tablas 2F-2J**. En algunas realizaciones, una célula Treg T comprende cualquiera de las configuraciones HC-SAR de las **Tablas 2F-2J**.

[00417] De acuerdo con algunas realizaciones del presente documento, se proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite. Se puede administrar al sujeto una célula inmunitaria (T, NK, NKT, etc.) que comprende ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las configuraciones SAR descritas en el presente documento. Opcionalmente, la célula inmunitaria (T, NK, NKT, etc.) expresa cualquiera de las configuraciones SAR descritas en el presente documento. Opcionalmente, la célula inmunitaria (T, NK, NKT etc.) codifica cualquiera de las configuraciones SAR descritas en el presente documento y puede inducirse posteriormente para que las exprese. En algunas realizaciones, la

célula inmunitaria (T, NK, NKT, etc.) es autóloga. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es alogénica.

[00418] En una realización, las células que expresan SAR (HC-SAR) se administran con una célula madre en la que uno o más antígenos diana del SAR se han eliminado o mutado a una forma que ya no es reconocida por el SAR (*p.ej.*, HC-SAR). En una realización, el uno o más antígenos diana se seleccionan de entre los antígenos enumerados en la **Tabla B**. En una realización, el uno o más antígenos diana se seleccionan del grupo de CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD45, CD70, CD79b, CD123, CD138, CD157, CD179b, CD200R, CD276, CD324, MPL, FLT3, Lym1, Lym2, CS1, BCMA, CD138, GPRC5D, CLL1, CSF2RA, LAMP1, TSHR, TnAg, NKG2D, CXCR4, TCR β 1, TCR β 2, BST1, IL1RAP, ALK, Folate Receptor 1, ROR1 y TCRgd. En una realización, la célula madre es una célula madre hematopoyética autóloga o una célula madre hematopoyética alogénica.

[00419] Sin estar limitado por ninguna teoría, se contempla que la coadministración de las dos células T modificadas genéticamente puede potenciar la respuesta inmunitaria.

[00420] En algunas realizaciones, un vector que codifica un SAR se administra directamente a un sujeto. El vector puede proporcionar ácidos nucleicos que codifican las cadenas de un SAR a una célula T del sujeto, con el fin de proporcionar un SAR *in vivo*.

[00421] La cantidad eficaz de células inmunitarias administradas de acuerdo con algunas realizaciones del presente documento puede depender de diversos factores, *p.ej.*, las características del sujeto, el tipo de enfermedad que se está tratando, las características del SAR, los niveles de actividad de la célula que expresa SAR y/o el nivel de respuesta inmunitaria deseado. Opcionalmente, el artesano experto determina la cantidad de células inmunitarias administradas. En algunas realizaciones, se administran al menos unas 10 células T que expresan SAR al sujeto, *p.ej.*, al menos unas 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} células inmunitarias, incluyendo rangos entre dos cualquiera de los valores enumerados.

[00422] En algunas realizaciones, la célula que expresa SAR se administra mediante inyección intramuscular, inyección intravaginal, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, administración epicutánea o administración intradérmica.

[00423] Los métodos descritos en las secciones anteriores para generar células T que expresen HC-SARs y utilizarlas para inducir la respuesta inmunitaria también pueden emplearse para otros SAR descritos en la presente divulgación.

[00424] La presente invención también presenta receptores quiméricos novedosos para la ingeniería de células redirigidas. Por ejemplo, la presente invención presenta una célula de ingeniería que coexpresa en su superficie un receptor de antígeno sintético (MHC-SAR) que comprende una porción de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (derivada de una

proteína MHC) directa o indirectamente fusionada a una porción de receptor de células no-T (TCR) (derivada de una proteína no-TCR); en la que la porción no-TCR no es parte de una proteína MHC.

[00425] En una realización, el receptor de células no-T comprende un módulo receptor de células no-T (NTCRM). En algunas realizaciones, la porción no-TCR comprende un dominio transmembrana del receptor de señalización no-TCR o un adaptador de señalización y la porción MHC comprende un dominio extracelular de la proteína MHC. En algunas realizaciones, la porción no-TCR comprende al menos una porción de un dominio transmembrana del receptor de señalización no-TCR o un adaptador de señalización y la porción MHC comprende al menos una porción de un dominio extracelular de la proteína MHC. En algunas realizaciones, la porción no-TCR comprende al menos una porción de un dominio transmembrana y al menos una porción de un dominio citoplasmático de un receptor de señalización no-TCR o un adaptador de señalización, y la porción MHC comprende al menos una porción de un dominio extracelular de la proteína MHC.

[00426] En una realización, la porción MHC carece total o parcialmente del dominio C1 similar a Ig. En una realización, la porción MHC comprende la región N-terminal de su dominio extracelular (es decir, dominio MHC 1 o MHC-D1) y comprende una delección en la región C-terminal C1 similar a Ig (es decir, dominio MHC 2 o MHC-D2) del dominio extracelular. En una realización, la porción MHC comprende la región N-terminal del dominio extracelular (es decir, dominio MHC 1 o MHC-D1) que está unida a una porción TCR, una porción no-TCR, un adaptador de señalización o un NTCRM a través de un enlazador. En una realización, el enlazador es un enlazador similar a Ig. En una realización, el enlazador similar a Ig se deriva de una proteína distinta de la proteína MHC de la que se deriva la región N-terminal. En una realización, la región enlazadora se deriva de una proteína CMH distinta de la proteína CMH de la que se deriva la región N-terminal. En una realización, el enlazador se deriva de una inmunoglobulina o de una cadena constante TCR. En la **Tabla 7** de la solicitud de patente provisional se muestran ejemplos de enlazadores. En una realización, la porción MHC es un híbrido de dos o más proteínas MHC; es decir, la porción MHC comprende la región N-terminal (es decir, MHC-Dominio 1 o MHC-D1) derivada de una primera proteína MHC o variante de la misma y la región C-terminal (es decir, MHC-Dominio 1 o MHC-D1) derivada de una segunda proteína MHC, en la que la primera y la segunda proteínas MHC son diferentes (*p.ej.*, la primera proteína MHC es HLA-DRA y la segunda proteína MHC es HLA-DPA, etc.). En una realización, la porción MHC es un híbrido de dos o más proteínas; es decir, la porción MHC comprende la región N-terminal derivada de una proteína MHC o variante de la misma y la región C-terminal derivada de una inmunoglobulina o una cadena constante TCR.

[00427] En algunas realizaciones, la porción MHC del MHC-SAR es N-terminal a la porción TCR o no-TCR del MHC-SAR. En algunas realizaciones, la porción MHC está directamente fusionada a una porción TCR (*p.ej.*, cadena constante TCR), o un receptor de señalización no-TCR (*p.ej.*, CD16), un adaptador de señalización (*p.ej.*, CD3z, FCRG) o un NTCRM. En algunas realizaciones, la porción MHC está indirectamente unida a una porción TCR (*p.ej.*, cadena constante TCR), o un receptor de señalización no-TCR (*p.ej.*, CD16), un adaptador de señalización (*p.ej.*, CD3z, FCRG) o un NTCRM a través de un enlazador. En algunas realizaciones, el MHC-SAR comprende además uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (*p. ej.*, AABD, *p. ej.*, vL, vH, vHH, FHVH, Darpin, epítipo, ligando, receptor, adaptador, antígeno peptídico, etc.) que está unido operativamente al N-terminal o cerca del N-terminal de la porción MHC mediante un enlazador opcional. En una realización, el AABD es un antígeno peptídico. En algunas realizaciones, el MHC-SAR comprende además un antígeno peptídico integrado en la porción MHC, o directa o indirectamente fusionado a la porción MHC. En algunas realizaciones, el antígeno peptídico está unido a la porción MHC mediante un enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un péptido rico en glicina. En algunas realizaciones, el SCR comprende además un dominio transmembrana situado entre la porción de ligando del receptor de superficie celular y la porción de molécula de señalización. En algunas realizaciones, el MHC-SAR comprende además un antígeno peptídico integrado en la porción MHC, o fusionado directa o indirectamente a la porción MHC son proteínas de mamíferos (*p.ej.*, humanos, ratones, gatos, perros, etc.).

[00428] En algunas realizaciones, la proteína MHC comprende HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB, H2-Aa, H2-B1, H2-K1, H2-E8 beta, H2-EK alfa, H2-EK beta, una variante de las mismas, un fragmento de las mismas o una combinación de las mismas. En alguna realización, el TCR se selecciona del grupo de TCR α , TCR β 1, TCR β 2, TCR γ 1, TCR γ 2, TCR δ , o pre-TCR α o un fragmento del mismo, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el receptor de señalización no-TCR es un receptor natural. En algunas realizaciones, el adaptador de señalización se selecciona del grupo que consiste en: CD3 ζ , Fc ϵ R γ (FCRG), DAP10, DAP12 una variante del mismo, un fragmento del mismo, o una combinación de los mismos. La presente invención también presenta un receptor quimérico (MHC-SAR) como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el MHC-SAR puede comprender una porción de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) derivada de una proteína MHC directa o indirectamente unida a una porción de TCR o una porción de receptor de células no T (TCR) derivada de un receptor de señalización no-TCR o un adaptador de señalización, en el que el MHC-SAR está adaptado para unirse a un TCR de una célula diana.

[00429] La presente invención también presenta un método para eliminar una célula diana o reprogramar una célula diana (la célula diana que comprende un TCR). En algunas realizaciones, el método comprende introducir en la célula diana una célula modificada genéticamente que expresa en su superficie un receptor quimérico (MHC-SAR) según la presente invención, en el que el MHC-SAR es específico para el TCR de la célula diana, en el que tras la unión del MHC-SAR al TCR la célula modificada genéticamente (a) inicia una cascada de señalización que elimina la célula diana, o (b) instruye a la célula diana para que se diferencie a una función efectora específica. En algunas realizaciones, el método es para inmunoterapia, en algunas realizaciones, la célula diana es una célula T autoreactiva. En algunas realizaciones, el método es para inmunoterapia, en algunas realizaciones, la célula modificada genéticamente se introduce quirúrgicamente en un huésped (*p.ej.*, un mamífero). En algunas realizaciones, la célula diana es una célula T autoreactiva.

[00430] Los ejemplos de MHC-SAR que comprenden el péptido RQ13 y los dominios HLA-DRB-B1 y HLA-DRA-A1 unidos a diferentes cadenas de señalización se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 23780-23794 y SEQ ID NO (PRT): 23877-23891. Pueden generarse otros MHC-SAR dirigidos a diferentes TCR utilizando diferentes péptidos y dominios MHC D1.

[00431] La porción MHC puede comprender una o más proteínas MHC (*p.ej.*, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQ81, HLA-DRA, HLA-DRB1), uno o más fragmentos de las mismas, o combinaciones de los mismos.

[00432] En algunas realizaciones, el MHC-SAR comprende un antígeno peptídico. Un ejemplo no limitativo de un antígeno peptídico que puede utilizarse con el MHC-SAR es el péptido RQ13 RFYKTLRAEQ (SEQ ID NO: 23892)

[00433] En algunas realizaciones, el MHC-SAR comprende al menos una porción de una molécula MHC que permite la unión a un TCR apropiado. en algunas realizaciones, el MHC-SAR comprende al menos una porción de una molécula MHC que permite la unión a un TCR apropiado y al menos una porción de una molécula TCR (*p.ej.*, una porción de una molécula TCR que permite subunidades de señalización y/o complejación apropiadas tales como subunidades CD3) o una molécula no-TCR (*p.ej.*, una porción de CD16A, CD16B, NKp30, NKp44, NKp46, CD3z, FcRy, DAP10, etc.).

[00434] Se necesitan vectores virales que permitan la transducción de CMH en reposo y limiten el riesgo de integración multicopia. Existe una importante necesidad de vectores virales que permitan la transducción de células T, B y NK en reposo. La transducción génica en células NK utilizando vectores lentivirales pseudotipados VSVG también adolece del problema de la baja eficiencia.

[00435] Para liberar genes mediante un vector lentiviral en células hematopoyéticas (*p.ej.*, células madre CD34+, células NK, linfocitos T y B vírgenes, etc.), es necesario presentar en su superficie una proteína de envoltura "de entrada" que permita una fusión vector-célula eficiente. El proceso de incorporación de una glicoproteína de envoltura heteróloga en el núcleo de un vector lentiviral se denomina "pseudotipado". Durante mucho tiempo se ha utilizado el VSV-G asociado a núcleos virales derivados del VIH-1. Sin embargo, el uso de VSV-G-LV presenta desventajas. La toxicidad está asociada a la expresión a largo plazo de VSV-G, lo que dificulta la generación de líneas celulares estables. Además, los VSV-G-LV son sensibles al complemento humano, lo que los hace inadecuados para su uso *in vivo*. Sólo dosis elevadas de VSV-G-LVs (multiplicidad de infección = MOI de 50-100) permiten una transducción celular hCD34⁺ eficiente, lo que aumenta el riesgo de integración multicopia y, por tanto, la genotoxicidad (Di Nunzio et al. (2007) Hum. Gene Ther. 18:811-820). Los seres humanos también pueden desarrollar fuertes respuestas inmunitarias contra el VSV-G, lo que puede reducir la eficacia de una segunda administración de VSV-G-LV. Todos estos resultados limitan el uso *ex vivo* e *in vivo* de VSV-G-LVs.

[00436] La glicoproteína de envoltura quimérica que comprende los dominios extracelular y transmembrana de la glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia felina RD1 14 fusionada a la cola citoplasmática (designada TR) de la glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia murina A (MLV-A), denominada en el presente documento RD1 14/TR y descrita en la solicitud internacional WO 03/091442) parecía ser una glicoproteína de envoltura alternativa bastante buena. Sin embargo, los niveles de transducción se mantienen muy por debajo de los de VSV-G-LV y los títulos de RD1 14 son muy inferiores a los de VSV-G-LV. Además, la glicoproteína RD1 14/TR no puede penetrar eficazmente en las células murinas. Así pues, esta especificidad del receptor limita las posibilidades de trabajo con este LV, ya que la mayoría de los modelos de enfermedades preclínicas susceptibles de terapia génica son modelos murinos.

[00437] La solicitud de patente WO2013045639 describe vectores lentivirales pseudotipados con una glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura del retrovirus endógeno del babuino (BaEV) y el dominio de cola citoplasmática de una glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia murina (MLV) (BaEV/TR); o una glicoproteína modificada de la envoltura del BaEV en la que el dominio citoplasmático de la cola carece del péptido R inhibidor de la fusión (BaEVRless). Estas glicoproteínas de envoltura presentan propiedades de transducción especialmente adecuadas para la transferencia de genes a células hematopoyéticas, incluidas las CMH y las células T y B en reposo. La glicoproteína de envoltura BaEV/TR está representada por SEQ ID NO (DNA): 113 y SEQ ID NO (PRT): 8493, respectivamente. La

glicoproteína de envoltura BaEV modificada en la que el dominio de cola citoplasmática carece del péptido R inhibidor de la fusión (BaEVRless), tal como se describe en WO2013045639, está representada por SEQ ID NO (DNA): 37 y SEQ ID NO (PRT): 8417, respectivamente.

[00438] La solicitud de patente WO2013045639 describía que los nuevos pseudotipos de LV pueden transducir de forma muy eficiente y estable células hCD34⁺ hasta en un 70% a dosis bajas del vector y tras una estimulación leve con citoquinas.

[00439] Posteriormente, se demostró que los BaEV-LV transducen más eficientemente las células NK y las líneas de células NK en comparación con los VSV-G-LV. En un aspecto, la presente invención se basa en el descubrimiento inesperado y sorprendente de que la glicoproteína de envoltura BaEV modificada descrita en el documento WO2013045639 cuyo dominio de cola citoplasmática carece del péptido R inhibidor de la fusión (BaEVRless) tiene una eficacia de transducción génica muy pobre o insignificante en células hematopoyéticas, incluidas células NK y células T. La glicoproteína de envoltura de BaEV modificada cuyo dominio de cola citoplasmática carece del péptido R inhibidor de la fusión (BaEVRless) descrita en el documento WO2013045639 está representada por SEQ ID NO (DNA): 37 y SEQ ID NO (PRT): 8417, respectivamente.

[00440] En otro aspecto, la presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de cola citoplasmática carece del péptido R inhibidor de la fusión (BaEVRless) descrito en el documento WO2013045639, pero lleva secuencias de aminoácidos adicionales en el carboxi-terminal, muestra propiedades de transducción adecuadas para la transferencia de genes a células hematopoyéticas, incluidas HSC, células NK y células T y B en reposo.

[00441] En una realización, las secuencias de aminoácidos adicionales en el carboxi-terminal no se derivan de la cola citoplasmática (designada TR) de la glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia murina A (MLV-A). La cola citoplasmática (designada TR) de la glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia murina A (MLV-A) está representada por SEQ ID NO (DNA): 114 y SEQ ID NO (PRT): 8494. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada de la presente divulgación no es la glicoproteína de envoltura del retrovirus RD114 (SEQ ID NO: 8431).

[00442] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada de la presente divulgación no comprende la cola citoplasmática (designada TR) de la glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia murina A (MLV-A). En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada de la presente divulgación no comprende el dominio TR de la glicoproteína de envoltura de MLV-A, que está representado por SEQ ID NO (DNA): 114 o SEQ ID NO (PRT): 8494. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada de la

presente divulgación no consiste en el dominio TR de la glicoproteína de envoltura de MLV-A, que está representada por SEQ ID NO (DNA): 114 o SEQ ID NO (PRT): 8494. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada de la presente divulgación carece de SEQ ID NO (PRT): 8494.

[00443] En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación no es la glicoproteína de envoltura BaEV/TR, que está representada por SEQ ID NO (DNA): 113 y SEQ ID NO (PRT): 8493, respectivamente. En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación carece de uno o más (*p.ej.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, etc.) residuos de aminoácidos carboxi-terminales de SEQ ID NO (PRT): 8493.

[00444] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación añade al menos un (*p.ej.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, etc.) aminoácido al extremo carboxi de la envoltura de BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417) descrita en WO2013045639. En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación añade al menos dos aminoácidos al extremo carboxi de la envoltura BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417). En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación añade al menos tres aminoácidos al extremo carboxi de la envoltura BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417). En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación añade al menos cuatro aminoácidos al extremo carboxi de la envoltura BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417).

[00445] En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación añade más de un residuo de aminoácido (*p.ej.*, 2, 5, 10, 50, 99 residuos de aminoácido) al extremo carboxi de la glicoproteína de envoltura BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417).

[00446] En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación es al menos un aminoácido más larga que la glicoproteína de envoltura BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417). En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que es al menos un aminoácido más largo que el dominio citoplasmático de la glicoproteína de envoltura BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417). En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación es más de un aminoácido (*p.ej.*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 99 residuos de aminoácidos) más larga que la glicoproteína de envoltura de BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417). En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada de la presente divulgación no comprende el dominio TR, que está representado por SEQ ID NO (PRT): 8494.

[00447] En una realización, el primer aminoácido del dominio citoplasmático se calcula a partir de la Glicina en el residuo 525 del SEQ ID NO (PRT): 8416 u 8417.

[00448] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que tiene un aminoácido no aromático, un aminoácido básico, un aminoácido ácido, un aminoácido neutro, un aminoácido aromático, un aminoácido polar, un aminoácido cargado negativamente o un aminoácido cargado positivamente en la posición 23 del dominio citoplasmático. En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que tiene cualquier residuo de aminoácido en la posición 23 del dominio citoplasmático.

[00449] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que tiene al menos 23 residuos de aminoácidos de longitud y no comprende el dominio TR, que está representado por SEQ ID NO (PRT): 8494. En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que tiene más de 22 residuos de aminoácidos de longitud y no comprende el dominio TR representado por SEQ ID NO (PRT): 8494.

[00450] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático de al menos 23 (*p. ej.*, 23, 24, 25, 50, 100, 110 o más) residuos de aminoácidos.

[00451] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático de al menos 23 residuos de aminoácidos de longitud.

[00452] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que comprende entre 23 y 35 residuos de aminoácidos del dominio citoplasmático de la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo salvaje.

[00453] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que tiene los 31 residuos de aminoácidos N-terminales del dominio citoplasmático de la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo salvaje. En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que comprende o consiste en residuos de aminoácidos N-terminales 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24 o 23 del dominio citoplasmático de la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo salvaje. El dominio citoplasmático de la glicoproteína de envoltura del BaEV de tipo salvaje está representado por SEQ ID NO (PRT): 8444.

[00454] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que carece de los residuos de aminoácidos carboxi-

terminales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 de la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo salvaje. En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que carece de al menos los residuos de aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 carboxi-terminales de la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo salvaje.

[00455] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que carece de los 8 o más residuos de aminoácidos carboxi-terminales (*p.ej.*, 8, 9, 10, 11, 12, 13) de la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo salvaje.

[00456] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 50005-50010 o una variante funcional o un homólogo con al menos 75% (*p.ej.*, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) de identidad de secuencia de la misma. En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende un dominio citosólico con una secuencia representada por SEQ ID NO: 50011-50013 o una variante funcional o un homólogo con al menos 75% (*p.ej.*, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) de identidad de secuencia con una secuencia con SEQ ID NO: 50011-13 en el dominio citosólico.

[00457] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada de la presente divulgación está codificada por una secuencia de ácido nucleico que está optimizada en codones para la especie (*p.ej.*, humano, ratón, rata, hámster, mono, etc.) cuyas células se utilizan para generar las partículas lentivirales. En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada está optimizada para codón humano. Un ejemplo de glicoproteína de envoltura de BaEV modificada optimizada para codón humano se proporciona en SEQ ID NO (DNA): 70-96, 98, 115-122, y 264-275.

[00458] En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende una secuencia de ácido nucleico con SEQ ID NO (DNA): 70-96, 98, 115-122, y 264-275 o secuencia con al menos 75% identidad de secuencia con SEQ ID NO (DNA): 70-96, 98, 115-122, y 264-275.

[00459] En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con SEQ ID NO (PRT): 8450-8476, 8478, 8495-8502 y 8644-8655 o secuencia con al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID NO (PRT): 8450-8476, 8478, 8495-8502 y 8644-8655.

[00460] En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido

con un dominio extracelular con SEQ ID NO (PRT): 8442 o un polipéptido con un dominio extracelular con al menos 70, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99.9% de identidad de secuencia con SEQ ID NO (PRT): 8442. En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con un dominio extracelular con SEQ ID NO (PRT): 8442 o un polipéptido con un dominio extracelular con hasta 100 (*p.ej.*, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2 o 1) modificaciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO (PRT): 8442.

[00461] En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con un dominio transmembrana con SEQ ID NO (PRT): 8443 o un polipéptido con un dominio transmembrana con al menos 70, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99.9% de identidad de secuencia con SEQ ID NO (PRT): 8443. En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con un dominio transmembrana con SEQ ID NO (PRT): 8443 o un polipéptido con un dominio transmembrana con hasta 10 (*p.ej.*, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1) modificaciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO (PRT): 8443.

[00462] En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con SEQ ID NO (PRT): 8450-8476, 8478, 8495-8502 y 8644-8655 o un polipéptido con hasta 50 (*por ej.*, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2 o 1) modificaciones de aminoácidos en un polipéptido con SEQ ID NO (PRT): 8450-8476, 8478, 8495-8502 y 8644-8655.

[00463] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende una secuencia con SEQ ID NO (PRT): 8450-8476, 8478, 8495-8502, y 8644-8655 o secuencia con al menos 70, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99.9% de identidad de secuencia con SEQ ID NO (PRT): 8450-8476, 8478, 8495-8502, y 8644-8655.

[00464] En una realización, la glicoproteína modificada de la envoltura del BaEV comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 70% (*p. ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99.9%) identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NO (PRT): 8450-8476, 8478, 8495-8502 y 8644-8655 y que conservan una o más propiedades biológicas de la glicoproteína de envoltura codificada por SEQ ID NO (PRT): 8450-8476, 8478, 8495-8502 y 8644-8655. Las propiedades biológicas de ejemplo de la glicoproteína de envoltura incluyen la capacidad de inducir la fusión celular, formar trímeros, unirse a receptores de la superficie celular, expresarse en la superficie celular, pseudotipificar una partícula de virus y unirse a los transportadores hASCT1 y/o hASCT2, etc.

[00465] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende un polipéptido con un dominio extracelular representado por SEQ ID NO (PRT): 8442 o una variante funcional del mismo, incluyendo homólogos de otras especies. En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende un polipéptido con un dominio extracelular con al menos 70 (*p. ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99.9%) identidad de secuencia con SEQ ID NO (PRT): 8442 o un polipéptido con un dominio extracelular con hasta 50 (*p. ej.*, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2 o 1) modificaciones de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8442.

[00466] En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación no codifica para una glicoproteína de envoltura que consiste en SEQ ID NO (PRT): 8417 o 8493. En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación no codifica para una glicoproteína de envoltura que comprende un dominio citosólico que consiste o comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO (PRT): 8493 u 8494. En una realización, la variante del dominio extracelular de la glicoproteína de envoltura BaEV modificada de la presente divulgación conserva una o más propiedades biológicas del dominio extracelular de la glicoproteína de envoltura codificada por SEQ ID NO (PRT): 8442. Los ejemplos de propiedades biológicas incluyen la capacidad de inducir la fusión celular, formar trímeros, unirse a receptores de la superficie celular, expresarse en la superficie celular, pseudotipificar una partícula de virus y unirse a los transportadores hASCT1 y/o hASCT2, etc.

[00467] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende un dominio transmembrana con SEQ ID NO (PRT): 8443 o un dominio transmembrana con al menos 70% (*p. ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99.9%) de identidad de secuencia con SEQ ID NO (PRT): 8443. En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende un dominio transmembrana con SEQ ID NO (PRT): 8443 o un dominio transmembrana con hasta 10 (*p. ej.*, 10, 5, 2 o 1) modificaciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO (PRT): 8443.

[00468] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 70% (*p. ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99.9%) de identidad con cualquiera de los SEQ ID NO (PRT): 8450-8476, 8478, 8495-8502 y 8644-8655. En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 70% (*p. ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99.9%) de identidad con cualquiera de los SEQ ID NO (PRT): 8450-8476, 8478, 8495-8502, y 8644-8655 y que contienen uno o más de los motivos de aminoácidos representados por SEQ ID NO: 16775-16780, 31989-31991. En una realización, la glicoproteína

de envoltura modificada de la presente divulgación no es la glicoproteína de envoltura BaEV/TR (SEQ ID NO (PRT): 8493) ni la glicoproteína de envoltura BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417), respectivamente.

[00469] En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende un dominio extracelular con SEQ ID NO: 8442 o una variante funcional con al menos 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99.9%) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8442 y que carece de un dominio citosólico que consiste o comprende una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8493 o 8494. En una realización, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada comprende un dominio transmembrana con SEQ ID NO: 8443 o una variante funcional con al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8443 y que carece de un dominio citosólico que consiste o comprende una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8493 u 8494.

[00470] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada de la presente divulgación no es la glicoproteína de envoltura BaEV/TR (SEQ ID NO (PRT): 8493) ni la glicoproteína de envoltura BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417), respectivamente.

[00471] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada de la presente divulgación comprende en su dominio extracelular una o más de las secuencias seleccionadas del grupo de -SDGGG- (SEQ ID NO: 16775), LDLLTAE- (SEQ ID NO: 16776), SLAEVVLQNRR- (SEQ ID NO: 16777), SLAAVVLQNRR- (SEQ ID NO: 16778), SLAEVVLQNRRGLDLLTAE- (SEQ ID NO: 16779), SLAAVVLQNRRALDLLTAE- (SEQ ID NO: 16780), SLAGVVLQNRRALDLLTAE- (SEQ ID NO: 31990), VVLQNRR- (SEQ ID NO: 31991) o una variante con 1 o 2 sustituciones de aminoácidos o mutaciones de cualquiera de las secuencias anteriores. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada de la presente divulgación no es la glicoproteína de envoltura BaEV/TR [SEQ ID NO (PRT): 8493] ni la glicoproteína de envoltura BaEVRless [SEQ ID NO (PRT): 8417], respectivamente.

[00472] En una realización, la glicoproteína de envoltura BaEV modificada comprende una secuencia representada por la SEQ ID NO: 31989 en su dominio extracelular o una variante con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones o mutaciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 31989. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada de la presente divulgación no es la glicoproteína de envoltura BaEV/TR (SEQ ID NO (PRT): 8493) ni la glicoproteína de envoltura BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417), respectivamente.

[00473] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada no comprende una secuencia -SDGGG- (SEQ ID NO: 16775) en su dominio extracelular. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada comprende al menos un dominio de unión a antígeno exógeno (*p.ej.*, scFv, vHH, FHVH, dominios de unión a antígeno no inmunoglobulina, etc.) que

es capaz de unirse a un antígeno distinto. Los antígenos de ejemplo incluyen CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD33, CD13, CD19, NKp30, NKG2D, NKp40, NKp44, etc.

[00474] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia -SDGGG- (SEQ ID NO: 16775). En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada comprende al menos un dominio de unión a antígeno exógeno (*p.ej.*, scFv, vHH, FHVH, dominios de unión a antígeno no inmunoglobulina, etc.) que es capaz de unirse a un antígeno distinto. Los antígenos de ejemplo incluyen CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD33, CD13, CD19, NKp30, NKG2D, NKp40, NKp44, etc. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada carece de la capacidad de unirse a ASCT2 o tiene una unión reducida a ASCT2.

[00475] En una realización, la divulgación proporciona una glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada que puede utilizarse para el pseudotipado de vectores virales, incluidos los vectores lentivirales.

[00476] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada de la presente divulgación comprende una secuencia peptídica señal N-terminal no nativa. La secuencia peptídica señal no nativa se refiere a una secuencia peptídica señal que no forma parte de la secuencia peptídica señal de HERV-W1 de tipo salvajesalvaje. La secuencia del péptido señal HERV-W1 de tipo salvajesalvaje está representada por SEQ ID NO (DNA): 124 y SEQ ID NO (PRT): 8504. Un ejemplo de péptido señal no nativo es el péptido señal Igκ murino (mIgk-SP) y está representado por SEQ ID NO (DNA): 130 y SEQ ID NO (PRT): 8510. Otros ejemplos de péptidos señal no nativos son conocidos en la técnica e incluyen el péptido señal CD8a humano (SEQ ID NO: 301) y el péptido señal Ig humano (SEQ ID NO: 302).

[00477] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada de la presente divulgación carece del dominio citoplasmático completo de la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 de tipo salvaje representada por SEQ ID NO (DNA): 127 y SEQ ID NO (PRT): 8507. En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada tiene una delección parcial o completa del péptido de fusión R inhibidor. En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende una mutación en el dominio citosólico. En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende una sustitución parcial o completa del dominio citoplasmático endógeno de HERV-W1 por una secuencia peptídica no endógena (o extraña). En una realización, la secuencia peptídica no endógena se deriva del dominio citoplasmático de una glicoproteína de envoltura diferente. En una realización de ejemplo, la secuencia peptídica no endógena está representada por SEQ ID NO: 8494 u 8446 o mutantes de delección de lo anterior.

[00478] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende o contiene un dominio citoplasmático que tiene al menos 5 residuos de aminoácidos de longitud o más de 5 residuos de aminoácidos. El primer aminoácido del dominio citoplasmático se calcula a partir de la Glicina en el residuo 465 de SEQ ID NO: 8503 (proteína HERV-W1-wt).

[00479] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada de la presente divulgación comprende un dominio citoplasmático que comprende al menos 5 (*p.ej.*, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 25, 50 o 74) residuos de aminoácidos del dominio citoplasmático de la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 de tipo salvaje. En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada tiene un dominio citoplasmático que comprende los 51 residuos de aminoácidos N-terminales del dominio citoplasmático de la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 8503).

[00480] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada de la presente divulgación tiene un dominio citoplasmático que carece de los residuos de aminoácido carboxi-terminal 1-69 de la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 de tipo salvaje representada por SEQ ID NO: 8503.

[00481] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada tiene un dominio citoplasmático que carece de al menos los residuos de aminoácidos carboxi-terminales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 de tipo salvajesalvaje representada por SEQ ID NO:8503. En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada tiene un dominio citoplasmático que carece de al menos los residuos de aminoácidos 1-23 carboxi-terminales de la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 de tipo salvajesalvaje representada por SEQ ID NO:8503.

[00482] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada tiene un dominio citoplasmático que carece de los 23 residuos de aminoácidos carboxi-terminales de la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 de tipo salvaje representada por SEQ ID NO:8503. En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada con ácido nucleico comprende una secuencia con SEQ ID NO: 140-151, 159-164 y 201 y SEQ ID NO (PRT): 8520-8531, 8539-8544 y 8581.

[00483] En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con SEQ ID NO (PRT): 8520-8531, 8539-8544 y 8581 o un polipéptido con hasta 100 (*p. ej.*, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2 o 1) modificaciones de aminoácidos en un polipéptido con SEQ ID NO (PRT): 8520-8531, 8539-8544 y 8581.

[00484] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada está codificada por una secuencia de ácido nucleico que está optimizada para codón. Ejemplos de glicoproteína humana de envoltura de HERV-W1 modificada con codón optimizado se proporcionan en SEQ ID NO (DNA): 140-151, 159-164 y 201. En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende una secuencia de ácido nucleico con SEQ ID NO (DNA): 140-151, 159-164, 201 o una secuencia con al menos un 70% (*p.ej.*, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%) de identidad de secuencia con la anterior. En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con SEQ ID NO (PRT): 8520-8531, 8539-8544 y 8581 o secuencia con al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID NO (PRT): 8520-8531, 8539-8544 y 8581.

[00485] En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con un dominio extracelular con SEQ ID NO (PRT): 8505 u 8511 o un polipéptido con un dominio extracelular con al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID NO (PRT): 8505 u 8511 o con hasta 100 modificaciones de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8505 u 8511. En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura HERV-W1 modificada no comprende la secuencia del HERV-W1 de tipo salvaje, que está representado por SEQ ID NO (DNA): 8503. En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada no codifica para una glicoproteína de envoltura que comprende un dominio de péptido señal que consiste o comprende una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8504. En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura HERV-W1 modificada no codifica para una glicoproteína de envoltura que comprende un dominio citosólico que consiste en una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8507.

[00486] En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con un dominio transmembrana con SEQ ID NO (PRT): 8506 u 8512 un polipéptido con un dominio transmembrana con al menos 70, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO (PRT): 8506 u 8512. En una realización, el polinucleótido que codifica la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido con un dominio transmembrana con SEQ ID NO (PRT): 8506 u 8512 o un polipéptido con un dominio transmembrana con hasta 10 (*p.ej.*, 10, 7, 5, 2 o 1) modificaciones de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8506 u 8512.

[00487] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70% (*p.ej.*, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99.9%) de identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID NO (PRT): 8520-8531, 8539-8544 y 8581 y que conserva una o más propiedades biológicas de la glicoproteína de envoltura codificada por los anteriores. Las propiedades biológicas de ejemplo de la glicoproteína de envoltura incluyen la capacidad de inducir la fusión celular, formar trímeros, unirse a receptores de la superficie celular, expresarse en la superficie celular, pseudotipificar una partícula de virus y unirse a los transportadores hASCT1 y/o hASCT2, etc.

[00488] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada no está codificada por la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 139 o la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8519.

[00489] En una realización, la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada comprende un dominio transmembrana con SEQ ID NO:8506 o una variante funcional con al menos un 70% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8506 y que no comprende un péptido señal con SEQ ID NO: 8504 o que carece de un dominio citosólico que consiste o comprende una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO (PRT): 8507 o que carece de un dominio citosólico que consiste o comprende una secuencia de aminoácidos (GPCIFNLLVNFVSSRIEAVKL) con SEQ ID NO (PRT): 20384. En una realización, el dominio citosólico de la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada de la divulgación no es -GPCIFNLLVNFVSSRIEAVKL- (SEQ ID NO (PRT): 20384). En una realización, el dominio carboxi-terminal de la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada de la divulgación no es GPCIFNLLVNFVSSRIEAVKL (SEQ ID NO (PRT): 20384). En una realización, el dominio carboxi-terminal de la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada de la divulgación no termina en la secuencia GPCIFNLLVNFVSSRIEAVKL con SEQ ID NO (PRT): 20384.

[00490] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificadaHERV-W1 comprende una secuencia -SDGGG- (SEQ ID NO: 16775) en su dominio extracelular o una variante con 1 o 2 sustituciones de aminoácidos o mutaciones de la misma que conserva la capacidad de unirse a hASCT2. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada no comprende una secuencia -SDGGG- (SEQ ID NO: 16775) en su dominio extracelular. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada comprende al menos un dominio de unión a antígeno exógeno que es capaz de unirse a un antígeno distinto. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia -SDGGG- (SEQ ID NO: 16775). En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada carece de la capacidad de unirse a ASCT2 o tiene una unión reducida a ASCT2.

[00491] En una realización, la glicoproteína HERV-W1 modificada comprende en su dominio extracelular una o más de las secuencias seleccionadas del grupo de 1) LDLLTAE- (SEQ ID NO: 16776), 2) SLAEVVLQNRR (SEQ ID NO: 16777), 3) SLAAVVLQNRR (SEQ ID NO: 16778), 4) -SLAEVVLQNRRGLDLLTAE- (SEQ ID NO: 16779), 5) SLAAVVLQNRRALDLLTAE (SEQ ID NO: 16780), 6) SEQ ID NO: 31989 o una variante con 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos o mutaciones de los anteriores. En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada no es la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 (SEQ ID NO (PRT): 8503) ni la glicoproteína de envoltura de HERV-W1 (SEQ ID NO (PRT): 8419), respectivamente. En una realización, la glicoproteína de envoltura HERV-W1 modificada no es la glicoproteína de envoltura BaEV/TR (SEQ ID NO (PRT): 8493) o la glicoproteína de envoltura BaEVRless (SEQ ID NO (PRT): 8417), respectivamente.

[00492] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada es resistente al complemento.

[00493] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada se muta aún más para que pierda su capacidad de unirse a los transportadores hASCT1 y/o hASCT2. En una realización, las glicoproteínas de envoltura modificadas mutadas que pierden su capacidad de unirse a hASCT1 y/o hASCT2 comprenden uno o más dominios exógenos de unión a antígeno (*p.ej.*, scFv, vHH, FHVH, etc.) que les permiten unirse a uno o más antígenos diferentes (*p.ej.*, CD3, CD4, CD8, CD34, NKp30, NKp44, NKp46, CD16, NKG2D, CD13, CD33, etc.).

[00494] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada está diseñada en superficie para expresar dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, scFv, vHH, FHVH, andamiaje de unión a antígeno no inmunoglobulina, etc.) y citocinas que se unen a antígenos y/o receptores específicos. En ciertas realizaciones de ejemplo, la fracción diana se selecciona del grupo que consiste en la proteína Factor de Células Madre (SCF, KIT-ligando, KL, o factor de acero), TPO (trombopoyetina), o una fracción que se une a cKit (CD117), MPL, CD4, CD8, CD3, CD5, CD6, CD7, CD2, TCR alfa, TCR beta, TCR gamma, TCR delta, CD10, CD16, NKp44, NKp46, NKp30, NKG2D, CD34, CD110, CD33, CD14, CD68, CCR7, CD62L, CD25, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7 y CXCR3.

[00495] Por consiguiente, en ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona una partícula vírica modificada que comprende una envoltura modificada que alberga una proteína de fusión mutada, una proteína gag quimérica, una fracción diana modificada para unirse a una célula diana, en la que la proteína de fusión mutada no se une a su receptor natural; y un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés. En ciertas realizaciones de ejemplo, la proteína gag quimérica es la proteína gag del VIHx descrita en WO2021183761 (incorporada en su

totalidad por referencia en el presente documento). En ciertas realizaciones de ejemplo, la fracción diana se fusiona con la proteína de fusión mutada.

[00496] La divulgación también proporciona un vector que codifica la glicoproteína de envoltura modificada. En una realización, el vector es un vector plasmídico.

[00497] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada se expresa mediante transfección de un ARNm.

[00498] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada se expresa en las células de envasado mediante transfección transitoria. En una realización, las glicoproteínas modificadas de la envoltura se expresan en las células de empaquetado de forma estable. En una realización, las glicoproteínas de envoltura modificadas se empaquetan utilizando una cápside derivada de un retrovirus humano endógeno. En una realización, las glicoproteínas de envoltura modificadas se empaquetan utilizando proteínas gag y pol derivadas de un retrovirus humano endógeno.

[00499] En una realización, la glicoproteína de envoltura modificada (*p.ej.*, la glicoproteína BaEV o HERV-W1 modificada) se utiliza para pseudotipificar un virus. En una realización, el virus es un virus recombinante o un vector viral. En una realización, el vector viral es un vector retroviral, *p.ej.*, un vector retroviral γ o un vector lentiviral. En una realización, el vector viral codifica para una proteína terapéutica. En una realización, el vector viral codifica para un receptor de antígeno sintético (SAR). En una realización, el vector codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR). En una realización, el vector viral codifica para un CAR de nueva generación. En una realización, el vector viral pseudotipado codifica una proteína terapéutica, como β -globina, ADA, etc. En una realización, el vector viral pseudotipado codifica para un sistema de edición de genes (*p.ej.*, CRISP/Cas9, nucleasa de dedo Zn, etc.).

[00500] En una realización, el vector viral pseudotipado por la glicoproteína de envoltura modificada se utiliza para la administración de genes *ex vivo*. En una realización, el vector viral pseudotipado por la glicoproteína de envoltura modificada se utiliza para la administración de genes *in vivo*. En una realización, el vector viral pseudotipado por la glicoproteína de envoltura modificada se administra a un sujeto. En una realización, el vector viral pseudotipado por la glicoproteína de envoltura modificada se administra a un sujeto por cualquier vía, incluidas, entre otras, la vía intravenosa, la vía intraarterial, la vía intradérmica, la vía intraperitoneal, la vía intrapleural, la vía intranodal (*p.ej.*, inyección en un ganglio linfático), la vía intratumoral, la vía intralesional, la vía intratecal, etc. En una realización, el vector viral pseudotipado por la glicoproteína de envoltura modificada se administra a un sujeto mediante inyección en un órgano o un tejido, como el bazo, el hígado, el corazón, el pulmón, el ojo, el cerebro, el músculo, el hueso, el riñón, la tiroides, la grasa, el páncreas, etc.

[00501] En una realización, el sujeto recibe un agente antes, simultáneamente o después de la administración *in vivo* del vector. En una realización, el agente se selecciona del grupo de (*p. ej.*, antagonista de CXCR4, *p. ej.*, Plerixafor, BL-8040, BPRCX714, BPRCX807, etc.), una citoquina (*p. ej.*, G-CSF, GM-CSF, Neulasta o Pegfilgrastim, IL2, IL15), un anticuerpo activador de T o NK biespecífico o multiespecífico, un fármaco de molécula pequeña (*p. ej.*, un inhibidor de la tirosina quinasa, *p. ej.*, dasatinib), un fármaco inmunosupresor (*p. ej.*, rituximab, esteroides, inhibidor de la calcineurina), un antagonista de la IL6 (*p. ej.*, tocilizumab), un antagonista de la IL1 (*p. ej.*, anakinra), un agente antihistamínico (*p. ej.*, difenhidramina), un agente antipirético (*p. ej.*, paracetamol) o una combinación.

[00502] Así pues, la presente invención se refiere a una partícula vectorial viral pseudotipada para transferir material biológico a las células. En una realización, dicha partícula vectorial comprende al menos una proteína de envoltura BaEV o HERV-W1 modificada de la divulgación.

[00503] En una realización preferida, la célula hematopoyética diana no se preestimula con al menos una citoquina. En particular, no se preestimula con SCF, TPO y/o Fl.3-L. En otra realización preferida, la célula hematopoyética diana sólo se preestimula con SCF o TPO. En otra realización preferida, la célula hematopoyética diana sólo se preestimula con SCF y TPO.

[00504] Las partículas del vector lentiviral pseudotipadas con glicoproteínas de envoltura viral modificadas (*p. ej.*, mBaEV, mHERV-W1 o mSyncetin-1) también permiten una transducción altamente eficiente de células B en reposo, células NK y timocitos.

[00505] En una realización, las células NK totales recién aisladas se preestiman con IL2 y posteriormente se transducen con partículas de vector lentiviral pseudotipadas con glicoproteínas de envoltura viral modificadas (*p. ej.*, mBaEV, mHERV-W1 o mSyncetin-1) o variantes funcionales de las mismas, incluyendo homólogas de otras especies, de la presente divulgación.

[00506] En otra realización, tras la activación, las células NK humanas primarias pueden ser transducidas eficientemente utilizando las partículas vectoriales lentivirales pseudotipadas con glicoproteínas de envoltura viral modificadas (*p. ej.*, mBaEV, mHERV-W1 o mSyncetin-1) o variantes funcionales de las mismas, incluyendo homólogas de otras especies, de la presente divulgación, incluso sin necesidad de inhibidores de los mecanismos de defensa antiviral de las células NK, mientras que las células NK en reposo no pueden ser transducidas eficientemente por estas partículas vectoriales.

[00507] Preferentemente, las células NK se activan mediante agentes estimulantes, ya sea en forma soluble o unidos a la superficie, o mediante células alimentadoras, incluidas partes de células alimentadoras, como partículas de membrana. Más preferentemente, las células NK son activadas por al menos un factor de crecimiento como una citocina o combinaciones de factores

de crecimiento como citocinas, *p.ej.*, citocinas de cadena gamma común incluyendo, pero no limitadas a IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 o citocinas de la familia IL-1 incluyendo, pero no limitadas a IL-alfa, IL-beta, IL-18, IL-33, IL-36, IL-37 e IL-38.

[00508] La transducción de células (*p.ej.*, células madre hematopoyéticas, células NK, células T, células B, células dendríticas, células hepáticas, células del bazo, células cardíacas, células cerebrales, etc.) puede llevarse a cabo mediante la administración *in vivo* de partículas virales pseudotipadas con las glicoproteínas de envoltura viral modificadas (*p.ej.*, mBaEV, mHERV-W1 o mSyncetin-1) o variantes funcionales de las mismas de la presente divulgación. La administración *in vivo* de partículas virales puede llevarse a cabo por métodos conocidos en la técnica. Las vías de administración de ejemplo incluyen, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intracavitaria, intrapleural, intratecal, intrapericárdica, intratumoral. Alternativamente, las partículas virales pueden inyectarse directamente en órganos o tejidos, como el esplénico, hepático, cardíaco, etc.

[00509] Las glicoproteínas modificadas de la envoltura viral (*p.ej.*, HERV-W1 o syncetin-1) tienen una ventaja para la administración *in vivo*, ya que se derivan de retrovirus humanos endógenos y, por lo tanto, no son inmunogénicas.

[00510] En una realización, se administra al sujeto una dosis única de las partículas virales pseudotipadas con las glicoproteínas de envoltura viral modificadas (*p.ej.*, HERV-W1 o syncetin-1) de la divulgación. En una realización, se administra al sujeto una dosis múltiple de las partículas virales pseudotipadas con las glicoproteínas modificadas de la envoltura viral (*p.ej.*, HERV-W1 o syncetin-1) de la divulgación.

[00511] La presente invención también se refiere a un método para producir una partícula vectorial viral pseudotipada que comprende: a) transfectar una célula con: (i) al menos una primera secuencia de ácido nucleico que comprende un genoma derivado retroviral competente en empaquetamiento; (ii) al menos una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica proteínas del núcleo de dicho retrovirus, y (iii) al menos una tercera secuencia de ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica una glicoproteína de envoltura viral modificada de la divulgación. para producir una célula productora; b) mantener la célula productora en cultivo durante el tiempo suficiente para permitir la expresión de los ADNc para producir las proteínas codificadas; y c) permitir que las proteínas codificadas formen partículas de vector viral de la invención.

[00512] En una realización, la divulgación proporciona una partícula viral modificada por ingeniería de superficie o una partícula similar a un virus que comprende las glicoproteínas virales modificadas descritas en el presente documento y un informador. En una realización, el

informador es una luciferasa, *p.ej.*, una luciferasa marina, *p.ej.*, Nluc o Gluc. En una realización, el reportero se expresa en la superficie de la partícula viral o partícula similar al virus.

[00513] La divulgación también proporciona un método para medir el título de la partícula viral o partícula similar al virus descrita en el presente documento mediante la medición de la actividad del informador. En una realización, el título de la partícula viral o partícula similar al virus se mide mediante la adición de un sustrato. En una realización, el sustrato es coelenterazina o su derivado o D-luciferina o su derivado.

[00514] En una realización, la línea celular de empaquetamiento carece de la expresión de ASCT1 y/o ASCT2 o tiene una expresión reducida de ASCT1 y/o ASCT2. En una realización, la línea celular de empaquetamiento está expuesta a supresina. En una realización, la línea celular de empaquetamiento expresa supresina (SEQ ID NO:31994) (Sugimoto J et al, Scientific Reports, 2013). En una realización, la línea celular de empaquetamiento expresa un receptor que se une a un anticuerpo. En una realización, el receptor es un receptor Fc o un fragmento funcional o una variante u homólogo del mismo. En una realización, el receptor Fc se selecciona del grupo de CD64, CD16A, CD16B y CD32 o un fragmento funcional, variante u homólogo del mismo que conserva la capacidad de unirse a la región Fc o a un anticuerpo. En una realización, el receptor Fc comprende un dominio transmembrana o de anclaje de membrana. En una realización, el receptor Fc comprende al menos un dominio de unión a antígeno exógeno (no nativo) (*p.ej.*, scFv, vHH, FHVH, andamiaje de unión a antígeno no inmunoglobulina, etc.) dirigido a un antígeno. En una realización, el antígeno se selecciona del grupo de CD3, CD4, CD8, CD45, CD34, CD33, CD13, CD19, CD20, CD22, CD56, NKG2D, NKp30, NKp40, NKp46 o una combinación de los mismos. En una realización, la línea celular de empaquetamiento está diseñada para expresar más de un receptor Fc. En una realización, el receptor Fc no forma parte de la glicoproteína de la envoltura viral. En una realización, el receptor Fc se expresa en las membranas celulares de las células de empaquetamiento que se utilizan para producir el vector viral. En una realización, el receptor Fc comprende un dominio de anclaje de membrana (*p.ej.*, un enlazador GPI). En otra realización, el receptor Fc comprende una señal secretora. Los ejemplos de receptores Fc (CD64) se proporcionan en SEQ ID NO: 19762-19763 y SEQ ID NO (PRT): 20382-20383.

[00515] En otra realización, el receptor Fc se expresa en las células de empaquetamiento de forma estable. En otra realización, el receptor Fc se expresa en las células de empaquetamiento de forma transitoria.

[00516] En una realización, la divulgación proporciona una célula parental para la generación de líneas celulares productoras o empaquetadoras de partículas virales envueltas, en la que la célula parental está modificada genéticamente para disminuir la expresión de MHC-I, MHC-II,

β 2M en la superficie de la célula y/o está modificada genéticamente para sobreexpresar CD47 o un receptor Fc (*p.ej.*, CD64, CD16) incluyendo formas truncadas. En una realización, la línea celular parental está modificada genéticamente para sobreexpresar una citocina/ligando (*p.ej.*, CD137L), un receptor de citocina o una fracción diana (*p.ej.*, CD3 scFv, CD28 scFv, CD4 scFv, CD8 scFv, etc.).

[00517] En una realización, la línea celular de empaquetamiento carece de expresión de β 2M y CIITA. En una realización, la línea celular de empaquetamiento sobreexpresa CD47. En una realización, la línea celular de empaquetamiento carece de expresión de β 2M (β 2 macroglobulina), CIITA y sobreexpresa CD47 y CD64 (B2M-/-CIITA-/- CD47/CD64). En una realización, la línea celular de empaquetamiento carece de expresión de β 2M (β 2 macroglobulina), CIITA y sobreexpresa CD47 y CD16A/CD16B (B2M-/-CIITA-/- CD47/CD16A/CD16B).

[00518] En una realización, la partícula viral o partícula similar al virus carece de expresión de β 2M y CIITA. En una realización, la partícula vírica o similar sobreexpresa CD47. En una realización, la partícula viral p o partícula similar al virus carece de expresión de β 2M (β 2 microglobulina), CIITA y sobreexpresa CD47 y CD64 (B2M-/-CIITA-/- CD47/CD64). En una realización, la línea celular de empaquetamiento carece de expresión de β 2M (β 2 macroglobulina), CIITA y sobreexpresa CD47 y CD16A/CD16B (B2M-/-CIITA-/- CD47/CD16A/CD16B).

[00519] En una realización, la invención proporciona una célula productora o empaquetadora de partículas virales envueltas, en la que la célula está modificada genéticamente para disminuir la expresión de CD47 en la superficie de la célula. En una realización, la célula comprende una alteración por ingeniería genética de un gen que codifica β 2-microglobulina y/o una alteración por ingeniería genética de uno o más genes que codifican una cadena MHC-I a y/o CIITA y sobreexpresa o subexpresa CD47 y sobreexpresa CD64 y/o CD16A/CD16B.

[00520] En una realización, la línea celular de empaquetamiento expresa en su superficie (i) una primera proteína transmembrana mitogénica activadora de células T que comprende un dominio mitogénico que se une a CD3; y (ii) una segunda proteína transmembrana mitogénica activadora de células T que comprende un dominio mitogénico que opcionalmente se une a CD28. En una realización, tanto la primera como la segunda proteína comprenden un dominio transmembrana. En una realización, tanto la primera como la segunda proteína comprenden un dominio de anclaje de membrana (*p.ej.*, dominio unido a GPI) que no es un dominio transmembrana. En una realización, la primera o la segunda proteína comprenden un dominio transmembrana. En una realización, la primera o la segunda proteína comprenden un dominio de anclaje de membrana.

[00521] En una realización, se proporciona un vector viral (*p.ej.*, un vector retroviral o lentiviral) que tiene una envoltura viral que comprende: (i) una primera proteína transmembrana mitogénica activadora de células T que comprende un dominio mitogénico que se une a CD3; y (ii) una segunda proteína transmembrana mitogénica activadora de células T que comprende un dominio mitogénico que opcionalmente se une a CD28. En una realización, tanto la primera como la segunda proteína comprenden un dominio transmembrana. En una realización, tanto la primera como la segunda proteína comprenden un dominio de anclaje de membrana (*p.ej.*, dominio unido a GPI) que no es un dominio transmembrana. En una realización, la primera o la segunda proteína comprenden un dominio transmembrana. En una realización, la primera o la segunda proteína comprenden un dominio de anclaje de membrana.

[00522] A efectos de transfección, dichas secuencias de ácido nucleico primera, segunda y tercera pueden transportarse en un mismo vector, o en dos o tres vectores separados. En una realización, los genes gag, pol, rev, env (*p.ej.*, mBaEV, mHERV-W1), y casetes genómicos virales portadores de fragmentos de ácido nucleico diana se insertan de forma estable en el genoma de la célula huésped (*p.ej.*, células 293T) mediante un sistema de transposones sleeping beauty (SB) en combinación con un sistema de transposones Piggy BAC (Pb), y se desarrolla un sistema de producción viral capaz de inducir regulación y control en combinación con un sistema de expresión inducida (*p.ej.*, un sistema TET-ON y/o un sistema Cumate) para generar líneas celulares productoras estables.

[00523] En un aspecto de la invención, los genes GAG y POL (en las realizaciones en las que el GAG POL representa el gen GAG y el gen POL se localizan en la misma construcción y se traducen de forma desplazada), la transcripción del gen REV, la secuencia codificante de la glicoproteína de la envoltura viral (*p.ej.* mBaEV o mHERV-W1), y el casete de transcripción del genoma viral que porta el fragmento de ácido nucleico diana se controla, preferiblemente colocando el gen o la secuencia bajo el control de un sistema de expresión inducible, preferiblemente colocando el gen o la secuencia bajo el control de un sistema de expresión inducible TET-ON y/o CUMATE.

[00524] La presente invención también se refiere a un medicamento que comprende una partícula vectorial viral pseudotipada como se ha definido anteriormente como principio activo, en particular una partícula vectorial viral pseudotipada como se ha definido anteriormente que comprende además un material biológico que es preferentemente uno o más ácidos nucleicos.

[00525] También se refiere a una composición farmacéutica que comprende una partícula vectorial viral pseudotipada como se ha definido anteriormente, en particular una partícula vectorial viral pseudotipada como se ha definido anteriormente que comprende además un

material biológico que es preferentemente uno o más ácidos nucleicos, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[00526] La presente invención también se refiere a un método para tratar a un sujeto que lo necesita que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula vectorial viral pseudotipada como se ha definido anteriormente, en particular una partícula vectorial viral pseudotipada como se ha definido anteriormente que comprende además un material biológico que es preferiblemente uno o más ácidos nucleicos, al sujeto que lo necesita. Para la administración intravenosa, puede utilizarse una dosis unitaria de aproximadamente 5×10^8 a aproximadamente 10^9 partículas de vector viral pseudotipado como se define anteriormente, mientras que para la administración medular puede utilizarse una dosis unitaria de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 5×10^8 partículas de vector viral pseudotipado como se define anteriormente.

[00527] En una realización, la partícula vectorial viral pseudotipada de la invención se utiliza en el tratamiento de un trastorno hematopoyético o una enfermedad autoinmune. En una realización, la partícula vectorial viral pseudotipada de la invención se utiliza para terapia celular adoptiva. En una realización de ejemplo, la partícula de vector viral pseudotipada de la invención es para la generación de células T, NK o macrófagos modificados con receptores de antígenos quiméricos (CAR). En una realización, el CAR es un CAR de próxima generación.

[00528] En una realización, las células (*p.ej.*, CD34+ HSC, T, NK, NKT o macrófagos) se transducen con la partícula de vector viral pseudotipada de la invención y luego se expanden *ex vivo*. En una realización, las células se expanden *ex vivo* durante 1-100 días. En una realización, las células no se expanden *ex vivo*. En una realización, las células (*p.ej.*, CD34+ HSC, T, NK) se transducen con la partícula de vector viral pseudotipada de la invención *in vivo*.

[00529] En una realización, las células T, NK, NKT o macrófagos se transducen con la partícula vectorial viral pseudotipada con glicoproteínas de envoltura modificadas de la invención muestran mejor actividad modificadora de la enfermedad (*p. ej.*, actividad antitumoral, actividad antiinflamatoria) en comparación con las células T, NK, NKT o macrófagos transducidas con las partículas vectoriales virales seudotipadas con la glicoproteína de envoltura VSVG cuando se administra el mismo número de ambos tipos celulares a un sujeto necesitado. En una realización, las células se exponen a un agente que aumenta la expresión de ASCT1 y/o ASCT2.

[00530] En una realización, la presente divulgación proporciona partículas lentivirales de ingeniería de superficie que pueden generarse utilizando vectores multicistrónicos diseñados para expresar una pluralidad de polipéptidos, a saber, una glicoproteína de envoltura de babuino modificada o una glicoproteína de envoltura de HERV-W1 o una variante funcional de la misma

y una o más proteínas no virales capaces de desplegarse en la superficie viral. En los vectores multicistronicos de la divulgación, la pluralidad de polipéptidos está unida por enlazadores que comprenden péptidos capaces de inducir la omisión de ribosomas o la autoescisión. Pueden utilizarse péptidos 2A (*p.ej.*, T2A, P2A, E2A y F2A).

[00531] En un aspecto, la divulgación proporciona un vector multicistronico para partículas lentivirales de ingeniería de superficie, que comprende un polinucleótido unido operativamente a un promotor, en el que el polinucleótido codifica una pluralidad de polipéptidos unidos por enlazadores que comprenden péptidos capaces de inducir la omisión de ribosomas o la autoescisión, y en los que la pluralidad de polipéptidos comprende una glicoproteína de envoltura de babuino modificada (mBaEV) o una glicoproteína de envoltura de HERV-W1 (mHERV-W1) o una variante funcional de las mismas y una o más proteínas no virales capaces de desplegarse en la superficie viral.

[00532] En algunas realizaciones, los enlazadores comprenden péptidos 2A. En algunas realizaciones, la pluralidad de polipéptidos comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 proteínas capaces de desplegarse en la superficie viral.

[00533] En algunas realizaciones, las proteínas no virales capaces de desplegarse en la superficie viral comprenden una o más proteínas no virales seleccionadas de una fusión de dominio transmembrana de un fragmento variable de cadena única (scFv) específico para CD3 humano (anti-CD3 scFv), CD86 humano y CD137L humano, o variantes funcionales de los mismos.

[00534] En algunas realizaciones, la glicoproteína de fusión viral es una glicoproteína de envoltura de babuino modificada o una glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada o una variante funcional de las mismas; y la pluralidad de polipéptidos comprende el scFv anti-CD3, el CD86 humano y el CD137L humano, o variantes funcionales de los mismos. En algunas realizaciones, la pluralidad de polipéptidos consiste en una glicoproteína de envoltura de babuino modificada (mBaEV) o una glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada (mHERV-W1), el scFv anti-CD3, el CD86 humano y el CD137L humano, o variantes funcionales de los mismos. Ejemplos no limitantes de vectores multicistronicos de la divulgación incluyen los SEQ ID NOs (DNA): 31 y 32.

[00535] En algunas realizaciones, el vector multicistronico es un plásmido de envoltura lentiviral capaz de generar una partícula lentiviral pseudotipada con mBaEV o mHERV-W1 cuando se cotransfecta con un plásmido de transferencia y un plásmido de empaquetamiento en una línea celular de empaquetamiento. Los plásmidos de envoltura lentiviral de ejemplo se proporcionan en SEQ ID NO: 31 y 32.

[00536] En algunas realizaciones, el título de la partícula lentiviral de ingeniería de superficie es de al menos aproximadamente 1×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 4×10^7 , 6×10^7 , 8×10^7 , o 1×10^8 UI/ml.

[00537] En una realización, se administra al sujeto el vector viral encapsulado en un hidrogel. En una realización, se administra al sujeto la línea celular de empaquetamiento que genera el vector viral encapsulado en un hidrogel.

[00538] En una realización, la divulgación proporciona un método de administración de genes *in vivo* que comprende la administración de una partícula viral modificada a un sujeto que necesita la administración, en el que la partícula viral modificada es cualquier partícula viral o VLP, en el que la administración de la partícula viral modificada o VLP induce una actividad *in vivo* en una célula diana asociada con el polipéptido de interés (*p.ej.*, un SAR).

[00539] En algunas realizaciones, la partícula lentiviral comprende un agente diana o el vector de ácido nucleico codifica un agente diana. Algunos ejemplos de agentes diana incluyen anticuerpos, receptores de antígenos quiméricos (CAR), receptores de antígenos sintéticos ("SAR") y TCR recombinantes.

[00540] La presente divulgación proporciona métodos de transducción de células inmunitarias en un sujeto que los necesita, que comprenden a) administrar un anticuerpo multiespecífico para hacer que las células inmunitarias del sujeto sean más transducibles; y b) administrar un vector, opcionalmente un vector viral. En algunas realizaciones, el vector es un vector lentiviral. En algunas realizaciones, el vector viral está pseudotipado con una proteína de envoltura de virus humano endógeno (*p. ej.*, retrovirus humano endógeno, *p. ej.*, HERV-W1, HERV-FRD, etc.) o una variante de la misma. En algunas realizaciones, el vector viral está pseudotipado con proteínas de envoltura mBaEV, mHERV-W1 y/o VSVG. En algunas realizaciones, el vector viral está pegilado. En algunas realizaciones, el método transduce las células inmunitarias. En algunas realizaciones, las células inmunitarias son células T. En algunas realizaciones, el vector codifica un SAR seleccionado de entre CAR, SIR, Ab-TCR, MHC-SAR, zSIR, TFP, uTCR-SAR, SIR de cadena híbrida, Ab-TCR de cadena híbrida, CD16-SAR (*p.ej.*, SAR basado en CD16), NKp44 SAR, NKp46 SAR, NKp30 SAR, NKG2D-SAR.

[00541] En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno específico de células T. En algunas realizaciones, el antígeno de células T es CD3, CD4, CD8 o TCR. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión específico de antígeno de células NK. En algunas realizaciones, el antígeno de células NK es CD16A, NKp44, NKp46, NKp30 o NKG2D.

[00542] En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico comprende un segundo dominio de unión específico al antígeno. En algunas realizaciones, el segundo antígeno es CD19.

[00543] En algunas realizaciones, el vector lentiviral está pseudotipado con una proteína de envoltura mBaEV, mHERV-W1 y/o VSVG. En algunas realizaciones, el vector lentiviral está pseudotipado con una proteína de envoltura del virus Nipah.

[00544] En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a CD3 y CD19, en las que el vector es un vector lentiviral pseudotipado con una proteína de envoltura del virus mBaEV o mHERV-W1, y en las que el vector comprende un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 y opcionalmente un transgén que codifica un módulo accesorio.

[00545] La presente divulgación proporciona terapias combinadas para su uso en la transducción de células inmunitarias *in vivo*, que comprenden un anticuerpo multiespecífico y un vector, opcionalmente un vector viral, opcionalmente un vector viral pseudotipado con una proteína de la envoltura del virus mBaEV o mHERV-W1.

[00546] Los CAR pueden reconocer antígenos de forma independiente del CMH. Los métodos actuales de generación de células quiméricas que expresan receptores de antígenos (*p.ej.*, CAR-T, CAR-NK, etc.) implican la transducción génica *ex vivo* con un vector que codifica CAR (*p.ej.*, lentiviral, γ retroviral, transposón, etc.) o un transcrito de ARNm, seguida de la expansión *ex vivo* y la posterior administración de las células que expresan CAR al sujeto que las necesita. Sin embargo, se está considerando la administración *in vivo* de la construcción CAR/transcrito de ARNm para reducir costes y evitar retrasos asociados a la fabricación. Estos estudios se llevan a cabo generalmente con constructos CAR de cadena única de 2ª generación que comprenden un dominio de unión a antígeno (*p. ej.*, scFv, dominio vHH, etc.) unido a través de una región bisagra a un dominio transmembrana (*p. ej.*, dominio transmembrana CD8 o CD28) y que comprenden un dominio coestimulador citosólico (*p. ej.*, dominio coestimulador CD28 o 41BB) y un dominio de activación (*p. ej.*, CD3z o FcRy). El inventor ha hecho el sorprendente descubrimiento de que las construcciones CAR de cadena única de 2ª generación, tal como se están probando actualmente, no son adecuados para la administración génica *in vivo* de constructos CAR con el fin de generar células CAR-T. La presente solicitud describe por primera vez que la administración *in vivo* de constructos CAR de cadena única (*p.ej.*, CAR de primera y 2ª generación, y TFP) con el fin de generar células CAR *in vivo* no es segura y tiene el potencial de causar una recaída de la enfermedad. La presente solicitud describe además que las construcciones zSIR tampoco son ideales para la administración *in vivo* con el fin de generar células que expresen CAR (*p.ej.*, CAR-T, CAR-NK, CAR-monocitos, etc.). La presente

solicitud describe además que la administración *in vivo* de constructos CAR de cadena única (*p.ej.*, CAR de primera y segunda generación, y TFP) y zSIR puede dar lugar a su inserción ectópica y/o expresión en células malignas. La presente solicitud describe además que la administración *in vivo* de constructos CAR de cadena única (*p.ej.*, CAR de primera y 2ª generación, y TFP) y zSIR puede dar lugar a su expresión en células/tejidos sanos normales distintos de la célula diana prevista (*p.ej.*, T, NK, macrófago, etc.), lo que tiene el potencial de causar efectos secundarios.

[00547] La divulgación proporciona un método seguro, económico y eficiente para la generación *in vivo* de células CAR/SAR-T para el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, trastornos autoinmunes, degenerativos e infecciosos. A diferencia de los métodos actuales que se centran en dirigir la expresión de la construcción CAR a las células T, el método de la presente invención implica el uso de construcciones SAR (CAR) de diseño óptimo que muestran expresión selectiva sólo en células T. Por lo tanto, el método de la presente invención puede utilizarse para lograr la expresión selectiva del polipéptido SAR en células T sin necesidad de utilizar un vector especial dirigido a células T.

[00548] El método de la presente invención implica el uso de diseños SAR únicos que son superiores para la generación de SAR *in vivo*. En una realización, el método implica el uso de un diseño SAR adecuado que es un SAR de doble cadena y comprende dos dominios transmembrana. En una realización, el SAR del método de la invención comprende al menos una cadena polipeptídica que comprende al menos un fragmento que codifica el dominio transmembrana y citosólico que se selecciona del grupo de SEQ ID NO: 31985-31988 y 31992. En una realización, el SAR del método de la invención para la generación *in vivo* de células SAR-T es un SAR que codifica para dos cadenas polipeptídicas cada una de las cuales comprende al menos un fragmento seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 31985-31988 y 31992. En una realización, la divulgación proporciona un SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T que comprende al menos un fragmento con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia representada por SEQ ID NO: 40606-40758. En una realización, la divulgación proporciona un SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T que comprende al menos dos fragmentos con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia representada por SEQ ID NO: 40606-40758. En una realización, la divulgación proporciona un SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T que comprende un péptido conector (dominio bisagra) derivado de una cadena TCR α , β , γ , δ o pre-TCR α o una variante funcional o un fragmento de la misma. En una realización, la divulgación proporciona un SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T que comprende un péptido conector (dominio bisagra) y un dominio transmembrana derivado de una

cadena TCR α , β , γ , δ o pre-TCR α o una variante funcional o un fragmento de la misma. En una realización, la divulgación proporciona un SAR para administración *in vivo* que comprende un módulo receptor de células T. En una realización, el SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T no es un TCR. En una realización, la divulgación proporciona un SAR para la administración *in vivo* que es un SAR de cadena híbrida. En una realización, la divulgación proporciona un SAR para administración *in vivo* que es un SAR de cadena doble o un SAR de cadena y media. En una realización, la divulgación proporciona un SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T que comprende cadenas que interactúan con cadenas CD3 ϵ , CD3 γ y/o CD δ . En una realización, la divulgación proporciona un SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T que comprende al menos una cadena de señalización que interactúa con una cadena constante TCR seleccionada del grupo de cadenas TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ y pre-TCR α . En una realización, la divulgación proporciona un SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T que carece de un dominio transmembrana derivado de CD8, CD28, FcR γ o CD3z. En una realización, el método implica el uso de construcciones SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T que pueden reconocer antígeno de manera independiente del CMH. En una realización, el método implica el uso de construcciones SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T que pueden reconocer antígeno de manera dependiente del CMH. En una realización, el método implica el uso de una construcción SAR que comprende dominios de unión a antígeno no-TCR, es decir, dominios de unión a antígeno que no se derivan de un TCR. En una realización, el SAR comprende dominios de unión a antígeno derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (*p.ej.*, vL, vH, scFv, etc.), vHH, dominios de unión a antígeno no inmunoglobínicos (*p.ej.*, Darpin, centyrina, etc.). En una realización, el SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T comprende al menos un enlazador derivado de inmunoglobulinas (*p.ej.*, IgCL, IgG-CH1, etc.). En una realización, el SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T carece de al menos un enlazador derivado de inmunoglobulinas (*p.ej.*, IgCL, IgG-CH1, etc.). En una realización, el SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T carece de dos enlazadores derivados de inmunoglobulinas (*p.ej.*, IgCL, IgG-CH1, etc.). En una realización, el SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T no es un Ab-TCR. En una realización, un SAR adecuado para la administración *in vivo* para la generación de células SAR-T *in vivo* comprende uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, Fab, Fab2, scFv, vL, vH, vHH, FHVH, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, dominio extracelular de un receptor, dominio extracelular de un ligando/citoquina, autoantígeno, adaptador, epítipo, etc.) unido mediante enlazadores opcionales a al menos una cadena constante de TCR o fragmento funcional o variante funcional u homólogo del mismo, incluyendo homólogo de especies no humanas. En una realización, la cadena constante del TCR

o fragmento funcional o variante funcional u homólogo del mismo comprende un módulo receptor de células T que es capaz de reclutar al menos un módulo de señalización asociado al TCR cuando se expresa en una célula T. En una realización, el método enseña que los siguientes diseños de SIR muestran expresión sólo en célula T y no se expresan en células no T: OHC y SIR de doble cadena, SIR con cadenas TCR híbridas, OHC y Ab-TCR de doble cadena, OHC y Ab-TCR de doble cadena con cadena TCR híbrida, OHC y cTCR de doble cadena, OHC y cTCR de doble cadena con al menos una cadena TCR híbrida. En una realización, al menos una cadena del SAR es una cadena híbrida. En una realización, la divulgación proporciona un SAR para la generación *in vivo* de células SAR-T que comprende un dominio transmembrana derivado de la cadena TCR α , β , γ , δ o pre-TCR α o una variante funcional o un fragmento de la misma.

[00549] En una realización, el SAR muestra menos del 1% (*p.ej.*, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,02%, 0,01%, 0%) de expresión de la superficie celular a nivel proteico en células distintas de las células T (*p.ej.*, células no T) cuando se administra *in vivo*. En una realización, el SAR muestra menos del 1% (*p.ej.*, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,02%, 0,01%, 0%) de expresión de la superficie celular a nivel proteico en células cancerosas cuando se administra *in vivo*. En una realización, el cáncer no es de linaje de células T, *p.ej.*, linfoma de células B, LLA de células B, LMA, cáncer de próstata, cáncer de mama, etc. En una realización, las células cancerosas no expresan una o más cadenas CD3 seleccionadas del grupo de CD3 ϵ , CD3 γ y/o CD3 δ . En una realización, el SAR muestra menos del 1% (*p.ej.*, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,02%, 0,01%, 0%) de expresión de la superficie celular a nivel proteico en células sanas cuando se administra *in vivo*. En una realización, las células sanas comprenden una o más células B, macrófagos, neutrófilos, células hepáticas, células del bazo, células cardíacas, células pulmonares, células renales, células mamarias, células ováricas, células epiteliales, células cerebrales, células cutáneas, células gastrointestinales, células musculares, etc. En una realización, la expresión en la superficie celular de la proteína SAR en células T es al menos 2 veces (*p.ej.*, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces, 10.000 veces, 100.000 veces, un millón de veces, mil millones de veces o un billón de veces) mayor que su expresión en células no T. En una realización, el SAR muestra una incidencia inferior al 1% (*p.ej.*, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,02%, 0,01%, 0%) de segundos cánceres de células T cuando se administra *in vivo*. En una realización, la construcción SAR se administra *in vivo* utilizando un vector estándar. En una realización, la construcción SAR se administra *in vivo* utilizando un vector que no está dirigido específicamente a las células T. En una realización, la construcción SAR se administra *in vivo* utilizando un vector que no está modificado para reducir su inserción en células distintas de las células T. En una realización, el SAR para la administración *in vivo* se

administra utilizando un vector viral. En una realización, el SAR para la administración *in vivo* se administra utilizando una partícula similar a un virus. En una realización, el SAR para la administración *in vivo* se administra mediante una nanopartícula lipídica. En una realización, el SAR para la administración *in vivo* se administra mediante un vector pseudotipado con proteínas de envoltura estándar. En una realización, el SAR se administra mediante un vector que no está manipulado en superficie. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector que está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura de tipo salvaje. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector pseudotipado con una glicoproteína de envoltura que aún es capaz de unirse a su receptor nativo. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector que está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura seleccionada de una o más de VSV-G, glicoproteína de envoltura de babuino modificada, glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada, glicoproteína de envoltura de mono gibón o glicoproteína de Cocal. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector de ADN. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector de ARN. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un ARN circular. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un ARN transcrito *in vitro*. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector de transposasa.

[00550] En una realización, el vector es un vector retroviral, la diana es una célula T y el transgén es un SAR (*p.ej.*, un SIR, cTCR, Ab-TCR, HC-SAR, etc.). En otra realización, el vector es un vector retroviral, la diana es una célula que ha sido activada por la administración de un agente externo y el transgén codifica una actividad terapéutica. En esta y otras realizaciones, un vector retroviral puede ser replicante (RRV) o no replicante (RNV) y puede derivarse de cualquier virus integrador como un virus espumoso, un lentivirus, un retrovirus alfa, beta o gamma o elementos CRISPR y también incluye vectores integradores no virales como los basados en transposones como "Piggy-BAC" (Saito et al, Cytother. 16: 1257-1269, 2014) o "Sleeping Beauty". En otra realización, el vector es un vector retroviral, el agente activador es el factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) y el objetivo son las células CD34+. En otra realización, el vector es un vector retroviral gamma no replicante, la población diana son células T activadas de forma natural y el transgén es un SAR (*p.ej.*, un SIR, cTCR, Ab-TCR, HC-SAR, etc.). En otra realización, el vector es un vector retroviral gamma, la población celular diana es una población celular activada naturalmente y el transgén codifica un agente activador inmunitario. En otra realización, el vector es un vector retroviral gamma, la población diana son células T activadas de forma natural y el transgén es un SAR (*p.ej.*, un SIR, cTCR, Ab-TCR, HC-SAR, etc.). En otra realización, el SAR comprende un dominio de unión que se dirige a uno o más de los antígenos enumerados en la **Tabla B**.

[00551] En un aspecto, la presente divulgación proporciona una partícula viral que comprende un genoma vectorial que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un SAR, en el que el SAR se expresa selectivamente en células T *in vivo*. En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula lentiviral. En una realización, el vector está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura seleccionada de una o más de VSV-G, glicoproteína de envoltura de babuino modificada, glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada, glicoproteína de envoltura de mono gibón o glicoproteína de Cocal. En algunas realizaciones, la partícula viral comprende una envoltura viral que comprende una o más proteínas activadoras de células inmunitarias expuestas en la superficie y/o conjugadas con la superficie de la envoltura viral. En algunas realizaciones, la envoltura viral comprende un fragmento variable de cadena única anti-CD3 expuesto en la superficie y/o conjugado con la superficie de la envoltura viral. En algunas realizaciones, la envoltura viral comprende una glicoproteína de envoltura que está expuesta en la superficie y/o conjugada con la superficie de la envoltura viral. En algunas realizaciones, la envoltura viral comprende una glicoproteína Cocal expuesta en la superficie y/o conjugada a la superficie de la envoltura viral, opcionalmente en la que la glicoproteína Cocal comprende la mutación R354Q.

[00552] En una realización, la divulgación proporciona un método *in vivo* para generar una célula T que exprese SAR o una célula madre que pueda diferenciarse en una célula T. En una realización, el método *in vivo* da como resultado la expresión selectiva del SAR sólo en células T. En una realización, el método *in vivo* da como resultado la expresión selectiva del SAR solo en células que expresan al menos una cadena de células T seleccionada del grupo de cadenas constantes de receptores de células T α , β , γ , δ o pre-TCR α . En una realización, el método *in vivo* comprende un SAR que comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 31985-31988 y 31992. En una realización, el método *in vivo* para la generación de células SAR-T incluye un SAR que comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 40606-40758. En una realización, el SAR se dirige a uno o más antígenos de forma independiente del CMH. En una realización, el SAR se dirige a uno o más antígenos de manera dependiente del CMH. En una realización, el método comprende la administración *in vivo* de un polinucleótido recombinante que codifica un SAR. En una realización, el SAR comprende uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR unidos mediante enlazadores opcionales a al menos una cadena constante TCR o fragmento funcional o variante funcional u homólogo de la misma, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, la cadena constante de TCR o fragmento funcional o variante funcional u homólogo de la misma comprende un módulo receptor de células T que es capaz de reclutar al menos un módulo de señalización asociado a TCR cuando se expresa en una célula T. En una realización, el SAR comprende un fragmento

vL derivado de un anticuerpo unido mediante un enlazador opcional a una primera cadena TCR o fragmento de la misma y un fragmento vH derivado de ese anticuerpo unido mediante un enlazador opcional a una cadena TCR complementaria o fragmento de la misma de modo que cuando se expresan en una célula T los fragmentos vL y vH se asocian para generar un fragmento variable (Fv) que es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana y opcionalmente reclutar al menos un módulo de señalización del receptor de células T. En una realización, el SAR comprende uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) que se unen mediante un enlazador opcional al N-terminal o cerca del N-terminal del dominio de unión a antígeno no-TCR. En una realización, el polinucleótido recombinante codifica un SAR seleccionado del grupo de un SAR OHC, un SAR de doble cadena, un receptor quimérico de células T de cadena OHC (cTCR), un cTCR doble, un Ab-TCR OHC y un Ab-TCR de doble cadena. En una realización, el SAR, el cTCR y el Ab-TCR comprenden cadenas TCR híbridas.

[00553] En una realización, el método da como resultado un SAR que muestra menos del 1% (*p.ej.*, 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.02%, 0.01%, 0%) de expresión de la superficie celular a nivel proteico en células distintas de las células T (*p.ej.*, células no T) cuando se administra *in vivo*. En una realización, el método da como resultado un SAR que muestra menos del 1% (*p.ej.*, 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.02%, 0.01%, 0%) de expresión de la superficie celular a nivel proteico en células cancerosas cuando se administra *in vivo*. En una realización, el cáncer no es de linaje de células T, *p.ej.*, linfoma de células B, LLA de células B, LMA, cáncer de próstata, cáncer de mama, etc. En una realización, las células cancerosas no expresan una o más cadenas CD3 seleccionadas del grupo de CD3 ϵ , CD3 γ y/o CD3 δ . En una realización, el método da como resultado un SAR que muestra menos del 1% (*p.ej.*, 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.02%, 0.01%, 0%) de expresión de la superficie celular a nivel de proteína en células sanas cuando se administra *in vivo*. En una realización, las células sanas comprenden una o más células B, macrófagos, neutrófilos, células hepáticas, células del bazo, células cardíacas, células pulmonares, células renales, células mamarias, células ováricas, células epiteliales, células cerebrales, células cutáneas, células gastrointestinales, células musculares, etc. En una realización, el método da como resultado una expresión en la superficie celular de la proteína SAR en células T que es al menos 2 veces (*p.ej.*, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces, 10.000 veces, 100.000 veces, un millón de veces, mil millones de veces o un billón de veces) mayor que su expresión en células no T. En una realización, el método da como resultado un SAR que muestra una incidencia inferior al 1% (*p.ej.*, 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.02%, 0.01%, 0%) de segundos cánceres de células T cuando se administra *in vivo*. En una realización, el método administra la construcción SAR *in vivo* utilizando un vector estándar. En una realización, el método administra la construcción SAR *in vivo* utilizando un vector que

no está dirigido específicamente a células T. En una realización, el método administra la construcción SAR *in vivo* utilizando un vector que no está modificado para reducir su inserción en células distintas de las células T. En una realización, el método suministra el SAR para su administración *in vivo* utilizando un vector viral. En una realización, el método entrega el SAR para su administración *in vivo* utilizando una partícula similar a un virus. En una realización, el SAR para la administración *in vivo* se administra mediante una nanopartícula lipídica. En una realización, el SAR para la administración *in vivo* se administra utilizando un vector pseudotipado con proteínas de envoltura estándar. En una realización, el SAR se administra mediante un vector que no está manipulado en superficie. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector que está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura de tipo salvaje. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector pseudotipado con una glicoproteína de envoltura que aún es capaz de unirse a su receptor nativo. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector que está pseudotipado con una glicoproteína de envoltura seleccionada de una o más de VSV-G, glicoproteína de envoltura de babuino modificada, glicoproteína de envoltura de HERV-W1 modificada, glicoproteína de envoltura de mono gibbon. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector de ADN o un vector de ARN. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un ARN circular. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un ARN transcrito *in vitro*. En una realización, el SAR se administra *in vivo* utilizando un vector de transposasa.

[00554] En una realización, la divulgación proporciona un vector para la generación *in vivo* de una célula T que expresa SAR o una célula madre que puede diferenciarse en una célula T. En una realización, el vector da lugar a la expresión selectiva del SAR sólo en células T. En una realización, el vector da lugar a la expresión selectiva del SAR sólo en células que expresan al menos una cadena de células T seleccionada del grupo de cadenas constantes de receptores de células T α , β , γ , δ o pre-TCR α . En una realización, el SAR se dirige a uno o más antígenos de manera dependiente y/o independiente del CMH. En una realización, el vector comprende un polinucleótido recombinante que codifica un SAR, donde el SAR comprende uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR unidos mediante enlazadores opcionales a al menos una cadena constante TCR o fragmento funcional o variante funcional u homólogo de la misma, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, la cadena constante de TCR o fragmento funcional o variante funcional u homólogo de la misma comprende un módulo receptor de células T que es capaz de reclutar al menos un módulo de señalización asociado a TCR cuando se expresa en una célula T. En una realización, el SAR comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 31985-31988 y 31992. En una realización, el SAR comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 40606-40758. En una realización, el SAR

comprende un fragmento vL derivado de un anticuerpo unido mediante un enlazador opcional a una primera cadena TCR o fragmento de la misma y un fragmento vH derivado de ese anticuerpo unido mediante un enlazador opcional a una cadena TCR complementaria o fragmento de la misma de modo que cuando se expresan en una célula T los fragmentos vL y vH se asocian para generar un fragmento variable (Fv) que es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana y opcionalmente reclutar al menos un módulo de señalización del receptor de células T. En una realización, el SAR comprende uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) que se unen mediante un enlazador opcional al N-terminal o cerca del N-terminal del dominio de unión a antígeno no-TCR. En una realización, el polinucleótido recombinante codifica un SAR seleccionado del grupo de un SAR OHC, un SAR de doble cadena, un receptor quimérico de células T (cTCR) de cadena OHC, un cTCR doble, un Ab-TCR OHC y un Ab-TCR de doble cadena. En una realización, el SAR, el cTCR y el Ab-TCR comprenden cadenas TCR híbridas. En una realización, el vector se selecciona del grupo de un vector viral (*p.ej.*, vector lentiviral, vector γ retroviral, vector adenoviral, vector AAV, vector vaccinia, vector herpes simplex, vector baculoviral, etc.), un vector no viral (*p.ej.*, partículas similares a virus, nanopartículas lipídicas, etc.), un vector de ADN, un vector de ARN, un transposón (*p.ej.*, el transposón sleeping beauty o el transposón Piggy-BAC). En una realización, el vector viral está pseudotipado con mBaEV, BaEV-TR, mHERV-W1, VSVG, envoltura del mono gibón, proteína de fusión del virus del sarampión, proteína de fusión del virus Nipah. En una realización, el vector viral se utiliza como vacuna.

[00555] En una realización, la divulgación proporciona un sistema recombinante para generar una célula T que exprese SAR o una célula madre que pueda diferenciarse en una célula T. En una realización, el sistema recombinante da lugar a la expresión selectiva del SAR sólo en células T. En una realización, el vector del sistema recombinante da lugar a la expresión selectiva del SAR sólo en células que expresan al menos una cadena de células T seleccionada del grupo de cadenas constantes de receptores de células T α , β , γ , δ o pre-TCR α . En una realización, el SAR se dirige a uno o más antígenos de manera dependiente y/o independiente del CMH. En una realización, el sistema recombinante comprende un polinucleótido recombinante que codifica un SAR, en el que el SAR comprende uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR (*p.ej.*, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, Fab, Fab2, scFv, vL, vH, vHH, FHVH, andamio de unión a antígeno no inmunoglobulina, dominio extracelular de un receptor, dominio extracelular de un ligando/citoquina, autoantígeno, adaptador, epítipo, etc.) unido mediante enlazadores opcionales a al menos una cadena constante de TCR o fragmento funcional o variante funcional u homólogo de la misma, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, la cadena constante del TCR o fragmento funcional o variante

funcional u homólogo del mismo comprende un módulo receptor de células T que es capaz de reclutar al menos un módulo de señalización asociado al TCR cuando se expresa en una célula T. En una realización, el sistema recombinante comprende un SAR que comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 31985-31988 y 31992. En una realización, el sistema recombinante comprende un SAR que comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 40606-40758. En una realización, el polinucleótido recombinante codifica un SAR seleccionado del grupo de un SIR OHC, un SIR de doble cadena, un receptor quimérico de células T (cTCR) de cadena OHC, un cTCR doble, un Ab-TCR OHC y un Ab-TCR de doble cadena. En una realización, el SIR, el cTCR y el Ab-TCR comprenden cadenas TCR híbridas. En una realización, el sistema recombinante comprende un vector viral, un vector no viral (*p.ej.*, una partícula similar a un virus, una nanopartícula lipídica, etc.), un vector de ADN, un vector de ARN, un transposón (*p.ej.*, el transposón sleeping beauty o el transposón Piggy-BAC). En una realización, el sistema recombinante da lugar a la expresión del SIR, Ab-TCR o cTCR a partir del promotor de un gen de células T endógeno. En una realización, el sistema recombinante da lugar a la inserción del polinucleótido que codifica un SIR, Ab-TCR o cTCR en un locus génico de células T endógeno, en el que opcionalmente el locus génico de células T endógeno es el locus TRAC, TRBC, TRGC, TRDC o una combinación.

[00556] En una realización, la divulgación proporciona una célula T o célula madre que puede dar lugar a una célula T manipulada *in vivo* para expresar un SAR. En una realización, el vector da lugar a la expresión selectiva del SAR solo en células que expresan al menos una cadena de células T seleccionada del grupo de cadenas constantes de receptores de células T α , β , γ , δ o pre-TCR α . En una realización, el SAR se dirige a uno o más antígenos de manera dependiente y/o independiente del CMH. En una realización, la célula expresa un polinucleótido recombinante que codifica SAR o un fragmento del mismo. En una realización, el SAR comprende uno o más dominios de unión a antígeno no-TCR unidos mediante enlazadores opcionales a al menos una cadena constante TCR o fragmento funcional o variante funcional u homólogo de la misma, incluyendo homólogos de especies no humanas. En una realización, la cadena constante de TCR o fragmento funcional o variante funcional u homólogo de la misma comprende un módulo receptor de células T que es capaz de reclutar al menos un módulo de señalización asociado a TCR cuando se expresa en una célula T. En una realización, el SAR comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 31985-31988 y 31992. En una realización, el SAR comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 40606-40758. En una realización, el SAR comprende un fragmento vL derivado de un anticuerpo unido mediante un enlazador opcional a una primera cadena TCR o fragmento de la misma y un fragmento vH derivado de ese anticuerpo unido mediante un enlazador opcional a una cadena TCR

complementaria o fragmento de la misma de modo que cuando se expresan en una célula T los fragmentos vL y vH se asocian para generar un fragmento variable (Fv) que es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana y opcionalmente reclutar al menos un módulo de señalización del receptor de células T. En una realización, el SAR comprende uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) que están unidos mediante un enlazador opcional al N-terminal o cerca del N-terminal del dominio de unión a antígeno no-TCR. En una realización, la célula T o la célula madre que puede dar lugar a una célula T expresa un polinucleótido recombinante que codifica un SIR seleccionado del grupo de un SIR OHC, un SIR de doble cadena, un receptor quimérico de células T de cadena OHC (cTCR), un cTCR doble, un Ab-TCR OHC y un Ab-TCR de doble cadena. En una realización, el SIR, el cTCR y el Ab-TCR comprenden una o más (es decir, dos) cadenas TCR híbridas. En una realización, la célula se diseña utilizando un sistema recombinante. En una realización, el sistema recombinante comprende un vector seleccionado del grupo de un vector viral (*p. ej.*, vector lentiviral, vector γ retroviral, vector adenoviral, vector AAV, vector vaccinia, vector baculoviral, etc.), un vector no viral (*p. ej.*, partículas similares a virus, nanopartículas lipídicas, etc.), un vector de ADN, un vector de ARN, un transposón (*p. ej.*, el transposón sleeping beauty o el transposón Piggy-BAC). En una realización, el vector viral está pseudotipado con mBaEV, BaEV-TR, mHERV-W1, VSVG, envoltura de simio gibón, proteína de fusión del virus del sarampión. En una realización, la célula se diseña utilizando un sistema recombinante que da lugar a la expresión del SIR, Ab-TCR o cTCR a partir del promotor de un gen de células T endógeno. En una realización, el sistema recombinante da lugar a la inserción del polinucleótido que codifica un SIR, Ab-TCR o cTCR en un locus génico de células T endógeno, en el que opcionalmente el locus génico de células T endógeno es el locus TRAC, TRBC, TRGC, TRDC o una combinación. En una realización, la célula T es una CD4, CD8, célula T ayudante, célula T citotóxica, Treg, célula T madre, NKT, célula T de memoria, célula T ingenua, célula T efectora o célula T sintética.

[00557] Una composición farmacéutica que da lugar a la generación *in vivo* de células T que expresan SAR. En una realización, la composición farmacéutica no da lugar a la expresión de SAR en células no T. En una realización, la composición farmacéutica comprende un SAR descrito en las secciones anteriores.

[00558] En una realización, la composición comprende un SAR que comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 31985-31988 y 31992. En una realización, la composición comprende un SAR que comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 40606-40758. En una realización, la composición comprende un SAR que comprende un fragmento vL derivado de un anticuerpo unido mediante un enlazador opcional a una primera cadena TCR o fragmento de la misma y un fragmento vH derivado de dicho anticuerpo unido

mediante un enlazador opcional a una cadena TCR complementaria o fragmento de la misma de modo que cuando se expresan en una célula T los fragmentos vL y vH se asocian para generar un fragmento variable (Fv) que es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana y opcionalmente reclutar al menos un módulo de señalización del receptor de células T. En una realización, la composición comprende un SAR que comprende uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) que están unidos mediante un enlazador opcional al N-terminal o cerca del N-terminal del dominio de unión a antígeno no-TCR. En una realización, la composición comprende un SAR que comprende un polinucleótido recombinante que codifica un SAR seleccionado del grupo de un SIR de OHC, un SIR de doble cadena, un receptor quimérico de células T (cTCR) de cadena OHC, un cTCR doble, un Ab-TCR de OHC y un Ab-TCR de doble cadena. En una realización, la composición comprende un SIR que comprende SIR, cTCR y Ab-TCR que comprenden una o más (es decir, dos) cadenas TCR híbridas. En una realización, la composición comprende un sistema recombinante que comprende un vector seleccionado del grupo de un vector viral, un vector no viral (*p.ej.*, una partícula similar a un virus, una nanopartícula lipídica, etc.), un vector de ADN, un vector de ARN, un transposón (*p.ej.*, el transposón de la bella durmiente o el transposón Piggy-BAC). En una realización, el vector viral está pseudotipado con mBaEV, BaEV-TR, mHERV-W1, VSVG, envoltura de simio gibón, proteína de fusión del virus del sarampión. En una realización, la célula se diseña utilizando una composición que comprende un sistema recombinante que da lugar a la expresión del SIR, Ab-TCR o cTCR a partir del promotor de un gen de células T endógeno. En una realización, el sistema recombinante da lugar a la inserción del polinucleótido que codifica un SIR, Ab-TCR o cTCR en un locus génico de células T endógeno, en el que opcionalmente el locus génico de células T endógeno es el locus TRAC, TRBC, TRGC, TRDC o una combinación. En una realización, la célula T es una CD4, CD8, célula T ayudante, célula T citotóxica, Treg, célula T madre, NKT, célula T de memoria, célula T ingenua, célula T efectora o célula T sintética.

[00559] En una realización, la invención proporciona un método para proporcionar inmunidad antienfermedad en un sujeto que comprende administrar al sujeto *in vivo* una cantidad eficaz de un polinucleótido recombinante o un sistema recombinante o un vector que da lugar a la expresión selectiva en la superficie celular de una proteína SAR sólo en células T. En una realización, el sujeto tiene cáncer, una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica o una enfermedad degenerativa. En una realización, el sujeto recibe una dosis única de polinucleótido recombinante o un sistema recombinante o un vector. En una realización, el sujeto recibe múltiples dosis de polinucleótido recombinante o un sistema recombinante o un vector. En una realización, el polinucleótido recombinante o un sistema recombinante o el vector

para la generación *in vivo* de células SAR-T se administra al sujeto por cualquier vía adecuada, incluyendo intravenosa, intranodal, intraperitoneal, intralinfática, intraesplénica, intraarterial, subcutánea, etc. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula viral al sujeto mediante inyección intraperitoneal, subcutánea o intranodal, en la que la partícula viral transduce células inmunitarias *in vivo*. En algunas realizaciones, la partícula viral se administra por inyección intranodal, opcionalmente a través del ganglio linfático inguinal.

[00560] En algunas realizaciones, se administran al sujeto al menos 2 millones, al menos 4 millones, al menos 6 millones, al menos 8 millones o al menos 10 millones de unidades transductores de partículas virales. En algunas realizaciones, la partícula viral se administra en una única inyección. En algunas realizaciones, la partícula viral se administra en al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 inyecciones.

[00561] En una realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno, transducir células inmunitarias *in vivo*, y/o generar una célula inmunitaria que exprese un SAR en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar la partícula vírica de la presente divulgación al sujeto. En algunas realizaciones, el método de la divulgación elimina la necesidad de preactivación de las células inmunes antes de la administración de la partícula viral. En algunas realizaciones, el método comprende ninguna preactivación de las células inmunitarias en el sujeto antes de la administración de la partícula viral (*p.ej.*, ninguna preactivación en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, o en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 semanas antes de la administración de la partícula viral). En algunas realizaciones, la preactivación de las células inmunitarias comprende la activación de la señalización CD3 y/o CD28 en las células inmunitarias (*p.ej.*, células T), opcionalmente mediante la administración de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, respectivamente. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método de la divulgación no comprende administrar agentes activadores de CD3 y/o CD28 por separado antes de la administración de la partícula viral.

[00562] En algunas realizaciones, se administra al sujeto un polinucleótido que codifica un SAR que permite la producción del SAR *in vivo*. En algunas realizaciones, la administración de dicho polinucleótido genera un efecto *in vivo* similar a la administración directa del SAR. En algunas realizaciones, la administración de dicho polinucleótido mejora la eficacia de transducción *in vivo* de una partícula. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un ARNm.

[00563] En algunas realizaciones, la administración *in vivo* de dichos polinucleótidos genera la expresión del SAR a lo largo del tiempo (*p.ej.*, comenzando en cuestión de horas y durando varios días). En algunas realizaciones, la administración *in vivo* de tales polipéptidos da lugar a una farmacocinética, farmacodinámica y/o perfil de seguridad deseables del SAR codificado. En algunas realizaciones, el polinucleótido puede optimizarse por uno o más medios para evitar la activación inmunitaria, aumentar la estabilidad, reducir cualquier tendencia a agregarse, como con el tiempo, y/o evitar impurezas. Dicha optimización puede incluir el uso de nucleósidos modificados, modificados, y/o UTRs 5' particulares, UTRs 3', y/o modificaciones de la cola de poli(A) para mejorar la estabilidad intracelular y la eficiencia traslacional (véase, *p.ej.*, Stadler et al., 2017, Nat. Med.). Tales modificaciones son conocidas en la técnica.

[00564] Las estrategias para la administración *in vivo* de polinucleótidos (*p.ej.*, ARNm) son conocidas en la técnica. Para un resumen de las estrategias, véase Mol. Ther. 2019 Abr 10; 27(4): 710-728, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

[00565] En algunas realizaciones, la partícula viral se administra por una vía seleccionada del grupo que consiste en parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal e intralinfática. En algunas realizaciones, la partícula viral se administra varias veces.

[00566] En algunas realizaciones, la partícula lentiviral de la presente divulgación es una partícula de vector lentiviral (VLV) incompetente para la replicación y autoinactivable (SIN). En una realización, la partícula lentiviral comprende una glicoproteína de envoltura VSV-G, BaEV modificada o HERV-W1 modificada. En una realización, la partícula lentiviral comprende una envoltura viral de ingeniería de superficie que incluye la expresión de un fragmento variable de cadena única (scFv) anti-CD3 unido a membrana y la glicoproteína Cocal.

[00567] En algunas realizaciones, las partículas retrovirales y/o lentivirales de la divulgación comprenden un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un receptor que se une específicamente a un hapteno. En algunas realizaciones, una secuencia que codifica un receptor que se une específicamente al hapteno está operativamente unida a un promotor. Los promotores ilustrativos incluyen, sin limitación, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de CAG, un promotor de SV40, un promotor de SV40/CD43, un promotor de EF-la y un promotor de MND.

[00568] En algunas realizaciones, las partículas retrovirales comprenden potenciadores de transducción. En algunas realizaciones, las partículas retrovirales comprenden un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína activadora de células T. En algunas realizaciones, las partículas retrovirales comprenden un polinucleótido que comprende una

secuencia que codifica un receptor de unión a hapteno. En algunas realizaciones, las partículas retrovirales comprenden proteínas de marcado.

[00569] En algunas realizaciones, las partículas retrovirales comprenden un receptor de superficie celular que se une a un ligando en una célula huésped diana, permitiendo la transducción de la célula huésped.

[00570] En algunas realizaciones, la glicoproteína de la envoltura viral VSVG es una proteína de la cepa Cocal (glicoproteína Cocal), incluida la variante que contiene la mutación R354Q.

[00571] Se pueden utilizar varias glicoproteínas de fusión para pseudotipificar partículas lentivirales

[00572] En algunas realizaciones, la pseudotipificación de una glicoproteína de fusión o una variante funcional de la misma facilita la transducción dirigida de tipos celulares específicos, incluyendo, pero sin limitarse a, células T o células NK. En algunas realizaciones, la glicoproteína de fusión o variante funcional de la misma es/son polipéptido(s) de longitud completa, fragmento(s) funcional(es), homólogo(s), o variante(s) funcional(es) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) gp160, virus de la leucemia murina (MLV) gp70, virus de la leucemia de los simios gibón (GALV) gp70, virus de la leucemia felina (RD114) gp70, retrovirus anfotrópico (Ampho) gp70, 10A1 MLV (10A1) gp70, retrovirus ecotrópico (Eco) gp70, virus de la leucemia de los simios babuinos (BaEV) gp70, virus del sarampión (MV) H y F, virus Nipah (NiV) H y F, virus de la rabia (RabV) G, virus Mokola (MOKV) G, virus Ébola Zaire (EboZ) G, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) GP1 y GP2, baculovirus GP64, virus Chikungunya (CHIKV) El y E2, virus Ross River (RRV) El y E2, virus Semliki Forest (SFV) El y E2, virus Sindbis (SV) El y E2, virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) El y E2, virus de la encefalitis equina occidental (WEEV) El y E2, HA de la gripe A, B, C o D, HA del virus de la peste aviar (FPV), scFv anti-CD3, (CD3), virus de la estomatitis vesicular VSV-G, o virus Chandipura y virus Piry CNV-G y PRV-G.

[00573] En algunas realizaciones, la glicoproteína de fusión o variante funcional de la misma es un polipéptido de longitud completa, fragmento funcional, homólogo o variante funcional de la proteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular de Alagoas (VSAV), Vesiculovirus Carajas (CJSV), Vesiculovirus Chandipura (CHPV), Vesiculovirus Cocal (COCV), Virus de la Estomatitis Vesicular Indiana (VSIV), Vesiculovirus Isfahan (ISFV), Vesiculovirus Maraba (MARAV), Estomatitis Vesicular

[00574] Virus de Nueva Jersey (VSNJV), Virus de Bas-Congo (BASV). En algunas realizaciones, la glicoproteína de fusión o variante funcional de la misma es la proteína G del virus Cocal.

[00575] En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula lentivirus pseudotipada de la envoltura del virus Nipah (NiV) ("vector pseudotipado de la envoltura del Nipah"). En algunas realizaciones, el vector pseudotipado de la envoltura del virus Nipah se pseudotipifica utilizando las glicoproteínas NiV-F y NiV-G de la envoltura del virus Nipah. En algunas realizaciones, las glicoproteínas NiV-F y/o NiV-G de dicho vector pseudotipado de la envoltura del virus Nipah son variantes modificadas. En algunas realizaciones, las glicoproteínas NiV-F y/o NiV-G de dicho vector pseudotipado de envoltura de Nipah se modifican para incluir un dominio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno es EpCAM, CD4 o CD8.

[00576] En algunas realizaciones, la glicoproteína de una partícula viral pseudotipada de la envoltura se modifica para incluir un dominio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno es CD3. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena simple (scFv) anti-CD3. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno es un scFv murino humanizado CD3.

[00577] En algunas realizaciones, la partícula viral pseudotipada de la envoltura se modifica para incluir una glicoproteína de fusión o una variante funcional de la misma y un dominio de unión a antígeno o una variante funcional del mismo. En algunas realizaciones, la partícula viral pseudotipada de envoltura se modifica para incluir la proteína G del virus Cocal o una variante funcional de la misma y un scFv anti-CD3 o una variante funcional de la misma.

[00578] En algunas realizaciones, la partícula vectorial retroviral es de ingeniería de superficie. Se proporcionan métodos ilustrativos de ingeniería de superficie de una partícula vectorial retroviral en, *p.ej.*, WO 2019/200056, PCT/US2019/062675 y US 62/916,110, cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

[00579] En algunas realizaciones, la partícula retroviral se diseña en superficie para incluir una glicoproteína de fusión o una variante funcional de la misma y un dominio de unión a antígeno o una variante funcional del mismo. En algunas realizaciones, la partícula retroviral se diseña en superficie para incluir la proteína G del virus Cocal o una variante funcional de la misma y un scFv anti-CD3 o una variante funcional de la misma.

[00580] La presente divulgación proporciona diversas proteínas no virales capaces de desplegarse en la superficie viral. En algunas realizaciones, las proteínas no virales son moléculas coestimuladoras.

[00581] En algunas realizaciones, la molécula de activación o coestimulación de células T puede seleccionarse del grupo formado por un anticuerpo anti-CD3, un ligando CD28 (CD28L) y un ligando 41bb (41BBL o CD137L).

[00582] En algunas realizaciones, la molécula de activación o coestimulación de células T se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD3, un ligando para CD28 (*p.ej.*,

CD28L) y el ligando 41bb (41BBL o CD137L). CD86, también conocido como B7-2, es un ligando tanto para CD28 como para CTLA-4. En algunas realizaciones, el ligando de CD28 es CD86. CD80 es un ligando adicional para CD28. En algunas realizaciones, el ligando de CD28 es CD80. La proteína no viral puede ser una citoquina, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en IL-15, IL-7 e IL-2.

[00583] En algunas realizaciones, el vector de ingeniería de superficie comprende una proteína transmembrana que comprende un dominio mitogénico y/o un dominio basado en citocinas.

[00584] El dominio mitogénico puede comprender todo o parte de un anticuerpo u otra molécula que se une específicamente a un antígeno de superficie de células T. En algunas realizaciones, el vector comprende un anticuerpo anti-CD3s, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, acoplado a un dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el vector comprende un ligando para 4-1BB, o fragmento funcional del mismo, acoplado a su dominio transmembrana nativo o a un dominio transmembrana heterólogo.

[00585] El potenciador de transducción mitogénico y/o el potenciador de transducción basado en citocinas pueden comprender una "secuencia espaciadora" para conectar el dominio de unión a antígeno con el dominio transmembrana.

[00586] La partícula vírica de la presente invención puede comprender un potenciador de la transducción basado en citocinas en la envoltura vírica. El potenciador de transducción basado en citocinas puede comprender un dominio de citocina y un dominio transmembrana. El dominio de citocina puede comprender una citocina activadora de células T, como IL2, IL7 e IL15, o un fragmento funcional de la misma.

[00587] Una partícula vírica puede utilizarse para infectar células *in vivo* a cualquier dosis eficaz. En algunas realizaciones, la partícula vírica se administra a un sujeto *in vivo*, mediante inyección directa a la célula, tejido, órgano o sujeto que necesite terapia. Las partículas virales también pueden administrarse según el título viral (TU/mL). En algunas realizaciones, el título viral administrado es de aproximadamente 10^5 - 10^6 , aproximadamente 10^5 - 10^7 , 10^7 - 10^9 , aproximadamente 10^8 - 10^{10} .

[00588] En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula de virus adeno-asociado (AAV).

[00589] En una realización, el SAR comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 31985-31988 y 31992. En una realización, el SAR comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 40606-40758. En una realización, el SAR comprende una secuencia representada por SEQ ID NO: 33546-40513, 50054-55347.

[00590] Las formulaciones y composiciones de la presente divulgación pueden comprender una combinación de cualquier número de partículas virales y, opcionalmente, uno o más agentes farmacéuticos adicionales (polipéptidos, polinucleótidos, compuestos, etc.) formulados en composiciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para su administración a una célula, tejido, órgano o animal, ya sea solos o en combinación con una o más modalidades de terapia. En algunas realizaciones, el uno o más agentes farmacéuticos adicionales aumentan aún más la eficacia de transducción de los vectores.

[00591] En algunas realizaciones, la composición comprende además otros agentes, como, *p.ej.*, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, pequeñas moléculas o diversos agentes farmacéuticamente activos.

[00592] En algunas realizaciones, las composiciones y formulaciones de las partículas víricas utilizadas de acuerdo con la presente divulgación pueden prepararse para su almacenamiento mezclando una partícula vírica que tenga el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. En algunas realizaciones, se utilizan en la formulación uno o más agentes tensioactivos farmacéuticamente aceptables (surfactantes), tampones, agentes de isotonicidad, sales, aminoácidos, azúcares, estabilizantes y/o antioxidantes.

[00593] Los tensioactivos farmacéuticamente aceptables adecuados comprenden, entre otros, ésteres de polietileno-sorbitán-ácidos grasos, polietileno-polipropilenglicoles, polioxietileno-

[00594] estearatos y dodecil sulfatos de sodio. Los tampones adecuados comprenden, entre otros, tampones de histidina, tampones de citrato, tampones de succinato, tampones de acetato y tampones de fosfato.

[00595] Los agentes de isotonicidad se utilizan para proporcionar una formulación isotónica. En algunas realizaciones, los agentes de isotonicidad se utilizan generalmente en una cantidad total de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 350 mM.

[00596] En una realización, las células que expresan SAR se generan *in vivo* o *ex vivo* utilizando nanopartículas lipídicas (LNP). En una realización, las células que expresan SAR se generan *in vivo* o *ex vivo* utilizando ARN que codifica SAR. En una realización, el ARN es un ARN circular (*p.ej.*, oARNTM). En una realización, el ARN circular se suministra a las células *in vivo* o *ex vivo* después del empaquetamiento en LNP. Los métodos y composiciones para la generación de CAR *in vivo* utilizando ARN circular se proporcionan en el documento WO2023250375 que se incorpora en su totalidad por referencia en el presente documento.

[00597] En una realización, las células que expresan SAR se generan *in vivo* o *ex vivo* utilizando la orientación genómica. En una realización, la construcción SAR se dirige a un locus

génico endógeno de células T *in vivo* o *ex vivo* utilizando enfoques de orientación genómica conocidos en la técnica. En una realización de ejemplo, el locus génico de células T endógeno es el locus génico TRAC, TRBC, TCDC y/o TRGC. En una realización, la construcción SAR se expresa a partir del promotor de un gen TCR endógeno (*p.ej.*, TCR α , TCR β 1, TCR β 2, TCR γ , TCR δ , CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ o CD δ gen). En la técnica se conocen varias técnicas para la orientación genómica, como CRISP/Cas9, nucleasas Zn finger, ARCUS, ADN monocatenario, etc., pero sin limitarse a ellas.

[00598] En los documentos WO2022164935, WO2022109162, WO2020142780, WO2020106992, WO2021154839, WO2023215848, WO2019219836, WO2009013324A1, WO2016009326, WO2023250375 y Xin, Tianqing, Cheng, Li et. al. se proporcionan métodos y composiciones adicionales para la generación *in vivo* de células que expresan SAR (*p.ej.*, células SAR-T), Frontiers in Oncology vol 12, 2022, que se incorporan íntegramente por referencia al presente documento.

[00599] La divulgación proporciona además un método de control de la expresión y actividad de un receptor *in vitro* e *in vivo* mediante el control de la expresión y/o actividad de uno o más de sus componentes y/o mediador de señalización. El método puede ser útil en el tratamiento de diversas enfermedades que implican el uso de células que expresan el receptor.

[00600] En una realización, un guía de ARN y Cas9 se dirigen a una región del gen diana de interés para insertar (golpe genético) un casete de expresión del dominio de desestabilización de proteínas inducible por fármacos (DIPDD) presente en un vector diana de recombinación homóloga (HR). El vector de orientación HR contiene brazos de homología en los extremos 5' y 3' del casete de expresión homólogos al ADN genómico que rodea el locus del gen de interés. Al fusionar el dominio de desestabilización de proteínas inducibles por fármacos (DIPDD) en el marco con el gen diana de interés, la proteína de fusión resultante tras la expresión se hará susceptible a la degradación mediada por la proteasoma tras el tratamiento con un compuesto de molécula pequeña que se une al DIPDD. Ejemplos de DIPDD incluyen dTAG e ICBD (dominio de unión de IMiD Cerebelon). Los ejemplos de compuestos de molécula pequeña que pueden unirse a dTAG e ICBD e inducir la degradación mediada por la proteasoma incluyen dTAG-13 e IMiD (*p.ej.*, pomalidomida).

EJEMPLOS

[00601] Clonación de las envolturas de Babuino, HERV-W1 y HERV-FRD

[00602] Los vectores de expresión de mamíferos pcDNA3, pcDNA3.1(+) y pSectagA se obtuvieron de Invitrogen (ThermoFisher Scientific). Los fragmentos de genes que codifican las diferentes envolturas se encargaron a IDT y se clonaron en los vectores de expresión de mamíferos mediante técnicas estándar de biología molecular.

[00603] Generación de vectores lentivirales

[00604] Las construcciones SAR se clonaron en vectores lentivirales, retrovirales o transposones sleeping beauty. Los métodos para la generación de SAR (*p.ej.*, CARs de 2^a generación, SIRs, Ab-TCR y TFP, etc.), la generación y uso de proteínas de fusión GGS-NLuc, y la generación y uso de líneas celulares reporteras de luciferasa (*p.ej.*, GLuc y Luc146-1H2) para la medición de la citotoxicidad celular mediante los ensayos Matador (PCT/US2017/024843, PCT/US2017/025602, PCT/US2017/052344, PCT/US2017/064379, PCT/2020/014237 y PCT/US2018/53247), que se incorporan en su totalidad por referencia en el presente documento. Para la generación de virus con envoltura de babuino y HERV-W1, se transfectaron 10 µg de plásmido de transferencia en cada placa p100 junto con 1µg de plásmidos codificantes de envoltura de babuino o HERV-W1 y 6 µg de plásmido de empaquetamiento psPAX2. Para el pseudotipado con la envoltura VSVG, se utilizaron 10 µg de plásmido de transferencia, 3 µg de plásmido pLP/VSVG y 6 µg de plásmido de empaquetamiento psPAX2 por placa p100. La transfección se realizó en células 293FT utilizando polietileno amina (PEI) esencialmente como se ha descrito anteriormente (Natarajan et al, Scientific Reports, 10:2318) y PCT/US2018/53247. Las células 293FT se cultivaron en DMEM con un 10% de FCS (en lo sucesivo DMEM-10). Aproximadamente 48-72 horas después de la transfección, se recogieron todos los medios, se agruparon y se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto para eliminar cualquier resto celular y células no adherentes. El sobrenadante libre de células se filtró con un filtro de jeringa de 0,45 µm. En algunos casos, el sobrenadante se concentró aún más por centrifugación a 18,500 rpm durante 2 horas a 4°C. El sedimento viral se volvió a suspender en 1/10 del volumen inicial en medio XVIVO. El virus se utilizó fresco para infectar las células diana o se almacenan congelado en alícuotas a -80°C.

[00605] Infección de células T, células NK y PBMC

[00606] El aislamiento de células T y la infección con lentivirus que codifican SAR se realizaron esencialmente como se describe en PCT/US2018/53247. Se utilizó sangre de un donante sano para aislar células NK utilizando un kit de aislamiento de células NK (Miltenyi). Las células NK92 se obtuvieron de ATCC. Las células NK primarias y NK92 se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM) Alfa sin ribonucleósidos ni desoxirribonucleósidos suplementado con un 20% de suero bovino fetal, 0.2mM de inositol, 0.1mM de 2-mercaptoetanol, 2mM de L-glutamina, 1.5g/L de bicarbonato sódico y 0.02mM de ácido fólico. Para las células NK92, el medio se suplementó además con 200 UI/ml de IL2. Las células NK primarias se cultivaron y activaron con 500 IL/ml de IL2 durante 7 días antes de las infecciones. Las infecciones lentivirales se realizaron con el sobrenadante lentivirus concentrado mediante infección por centrifugación en placas de 6 pocillos. Para las células NK primarias,

aproximadamente 4 millones de células NK en 1.5 ml de medio de cultivo suplementado con 500 UI/ml de IL2 e infectadas con 500µl de virus concentrado sin polibreno. Para las células NK92, se utilizó 6ug/ml de polibreno. Las placas se centrifugaron a 2,800 rpm durante 90 min a 32°C durante 5 horas. Se cambió el medio después de 5 horas y se repitió la infección al día siguiente.

[00607] A menos que se especifique lo contrario, las células T primarias se infectaron con vectores lentivirales pseudotipados con VSVG y las células NK primarias se infectaron con vectores lentivirales pseudotipados con envoltura de babuino modificada, como 072622-SyCD2 (SEQ ID NO: 95).

[00608] Para la detección de SARs se utilizó la tinción con proteína L. FACS se realizó utilizando el analizador FACSVerse de BD Biosciences. Para medir la muerte celular, se utilizaron los ensayos Matador y Matador Glo descritos en PCT/US2017/052344 y Choi S et al, Scientific Reports volumen 11, 10002 (2021).

[00609] Infección de células NK92 con el virus de la envoltura del babuino

[00610] Se sembraron 1 millón de células NK92 (ATCC) en 100 µl de medio NK92 en cada pocillo de una placa de cultivo no tisular de 24 pocillos junto con 400 µl de virus concentrado y 6 µg/ml de polibreno. Las placas se centrifugaron a 2,800 RPM durante 90 min a 32°C seguido de incubación a 37°C durante 5 horas. El medio de cultivo se cambió a las 5 h y las células se expandieron durante 3 días. La expresión de GFP se comprobó 3 días después de la infección.

[00611] Experimento: Se infectaron células NK92, JNG y células NK primarias con un lentivirus que codificaba EGFP y que era pseudotipado con construcciones de envoltura sin BaEVR representadas por SEQ ID NO: 100-104. En la mayoría de los experimentos, el virus se concentró antes de la infección. Sorprendentemente, a pesar de los repetidos intentos, no se observó expresión de EGFP en las células diana en ninguna de las células cuando el lentivirus EGFP se pseudotipó con las envolturas BaEVRless Baboon representadas por SEQ ID NO: 100-104. Las construcciones con SEQ ID NO:100 y 101 se generaron en el vector pcDNA3.1 y se expresaron utilizando el promotor CMV. Las construcciones con SEQ ID NO: 102 se clonaron en el vector PsectagA y también se expresaron utilizando el promotor CMV. Por último, las construcciones con SEQ ID NO: 103 y 104 se expresaron utilizando el vector pRC bajo el promotor RSV. Sin embargo, la expresión de EGFP se observó cuando se añadió incluso un solo aminoácido al C-terminal de las construcciones BaEVRless representadas por SEQ ID NO: 100-104. Estas construcciones con un aminoácido adicional añadido al C-terminal de las construcciones BaEVRless están representadas por SEQ ID NO (DNA): 86-91 y 115 y SEQ ID NO (PRT):8466-8471 y 8495. Los resultados se muestran en la **Tabla 10**. Además, se observó

una expresión satisfactoria de EGFP en las células diana tras la transducción con vectores lentivirales pseudotipados con envolturas de babuino modificadas representadas por SEQ ID NO: 70-85 y 91-96 y 98. En un experimento, las construcciones con SEQ ID NO: 72-78 mostraron expresión de EGFP en el 22.0%, 33%, 8.2%, 50%, 25.8% y 61.3% de las células NK92, respectivamente (**Tabla 10**). También se observó una expresión muy eficiente de EGFP utilizando las envolturas BaEV modificadas representadas por SEQ ID NO: 95 y 98. Además, las envolturas BaEV modificadas representadas por SEQ ID NO: 86-94 y 115-122 mostraron niveles variables (entre el 2.7% y el 50%) de transferencia de EGFP a las células diana. En la Tabla siguiente se muestra una capacidad comparativa de los vectores lentivirus que codifican EGFP y pseudotipados con las envolturas BaEV modificadas indicadas en dos experimentos separados.

[00612] TABLA 10

SEQ ID NO	GFP % NK92	SEQ ID NO	GFP % NK92
70	4.23	86	18.91
72	22.00	87	11.96
73	33.20	88	5.45
74	8.23	89	36.43
75	25.89	90	28.77
78	61.35	91	11.17
98	43.14	115	7.44
78	12.02	70	18.75
76	15.04	71	14.35
		78	40.13
		95	35.73

[00613] Se infectaron células NK92 con un lentivirus que codificaba EGFP pseudotipado con las construcciones de envoltura HERV-W1. La expresión de EGFP se midió por citometría de flujo 48-72 horas después de la infección. Los SEQ ID NO de ácidos nucleicos y aminoácidos de los diferentes constructos (indicados por código de clon) se proporcionan en la **Tabla 2**. En el caso de la envoltura de HERV-W1, se observó que los lentivirus EGFP pseudotipados con la envoltura de HERV-W1 que incluía el péptido señal de tipo salvaje de HERV-W1 no eran capaces de transducir GFP en células NK92 o Jurkat. Estas construcciones llevaban diferentes delecciones C-terminales en su dominio citosólico. Estas construcciones están representadas por SEQ ID NO: 8514-8518. Por el contrario, los lentivirus EGFP pseudotipados con las envolturas HERV-W1 que comprenden un péptido señal exógeno derivado de la cadena Igκ murina fueron capaces de transferir la expresión EGFP a las células diana con éxito. Ejemplos de tales envolturas HERV-W1 con un péptido señal exógeno están representados por SEQ ID NO: 141-148 y 150-151, 201 y mostraron una transferencia exitosa del gen EGFP. Estas construcciones llevaban diferentes delecciones C-terminales en su dominio citosólico. Debe

entenderse que otros péptidos señal exógenos (*p.ej.*, el péptido señal CD8, el péptido señal IgH humana, etc.) pueden sustituir al péptido señal Ig murinak para permitir que la envoltura HERV-W1 pseudotipados con éxito un vector viral. Se observó un alto nivel de transferencia génica de EGFP con las construcciones HERV-W1 representadas por SEQ ID NO:145, 150, 159 y 201. Los resultados demostraron que varios virus modificados de babuino y HERV-W1 pseudotipados fueron capaces de infectar con éxito células NK92. Sin embargo, sorprendentemente, la envoltura BaEVRless no fue capaz de transferir EGFP cuando se utilizó para pseudotipificar un vector lentiviral codificador de EGFP. Además, sorprendentemente, las envolturas HERV-W1 con el péptido señal de tipo salvaje (nativo) no consiguieron transferir la expresión EGFP. Así pues, el HERV-W1 con un péptido señal exógeno y un dominio citosólico truncado es único entre las envolturas retrovirales humanas endógenas por su capacidad para pseudotipificar vectores virales.

[00614] Experimento. KG-1, una línea celular de leucemia de células madre CD34+, se infectó con un vector lentiviral que codifica GFP. El análisis de citometría de flujo confirmó la inducción eficaz de las células KG-1 con el virus pseudotipado babuino (SEQ ID NO: 95). Por el contrario, se observó una inducción muy pobre de GFP con el vector lentiviral de GFP pseudotipado con VSVG.

[00615] Experimento; Seguridad de las células SAR-T generadas *in vivo*

Se humanizan ratones hembra NSG MHCI/II^(DKO) con PBMC de donantes humanos sanos. Los animales reciben 1 millón de células NALM6-Luc por inyección en la vena de la cola seguida de la administración en la vena de la cola de partículas lentivirales (25-100 x 10⁸ unidades titulables (TU)) pseudotipadas con VSVG, babuino (SEQ ID NO: 78), HERV-W1 (SEQ ID NO:159) y envolturas Cocal o aCD3-Cocal y que contienen una carga útil que comprende diferentes SAR CD19. La generación *in vivo* de SAR-T se demuestra mediante citometría de flujo utilizando la proteína L y/o el ensayo Topanga en sangre periférica 1 semana después de la administración viral. La citometría de flujo demuestra la falta de expresión de los SAR con SEQ ID NO: 3250-3263, 3272-3274, 3931, 4967, 6003, 7039, 8106, 8160, 8178, 8196, 8124, 8142, 8214, 8232, 8250, 8268, 8286, 8304, 8322, 8340, 8358, 8376, 17437, 17462, 17433, 17463, 17511, 17581, 17610, 17640, 17669, 17699, 17728, 17758, 17787, 17817, 17846, 17876, 17905, 17935, 17994, 18023, 18053, 18082, 18112, 18141, 18171, 18200, 18230 en células NALM6 o linfocitos B de sangre periférica. Del mismo modo, la falta de expresión de las construcciones anteriores se observa en cualquiera de los tejidos normales (*p.ej.*, corazón, pulmón, hígado, intestino, riñón, etc.). Por el contrario, la expresión de SAR con SEQ ID NO: 3246-3249, 3264-3271, 3275-3282 se observa en NALM6, linfocitos B y en grado variable en diferentes tejidos sanos.

Cribado de dominios de unión a antígenos para su unión específica mediante el ensayo Malibu-Glo

[00616] Se genera una serie de nuevos dominios de unión a antígenos dirigidos a diferentes antígenos (SEQ ID NO: 388-398, 19804-19814), 32132-32194, 412-426, 32195-32213). Los fragmentos se clonan en un vector lentiviral para generar reactivos Malibu-Glo como se describe en el documento PCT/US2017/025602. El sobrenadante del reactivo Malibu-Glo que contiene las proteínas de fusión Nluc se utiliza para probar la unión específica a líneas celulares que expresan el antígeno diana mediante el ensayo Malibu-Glo. El aumento del pliegue en la actividad Luc con dominios de unión de ejemplo se muestra en la **Tabla 12**. Los ligantes seleccionados pueden usarse para generar construcciones SAR (*p.ej.*, SEQ ID NO:33860-40139, 40172-40511, 50054-50558) y probarse para ensayos *in vitro* e *in vivo*. Debe entenderse que los SAR tienen un formato modular y que los diversos módulos pueden sustituirse. Por lo tanto, basándose en los dominios de unión a antígeno y cadenas de señalización proporcionados en esta divulgación, es posible que una persona con conocimientos ordinarios en la materia desarrolle SAR adicionales con diferentes combinaciones de dominios de unión a antígeno, enlazadores y cadenas de señalización, incluyendo cadenas híbridas. Prevemos que este amplio panel de SAR pueda utilizarse para proporcionar una respuesta inmunitaria diversa. Además, a partir de este amplio panel de SAR, es posible seleccionar SAR con propiedades específicas (*p.ej.*, citotoxicidad, secreción de citocinas, expresión de la superficie celular, actividad *in vivo*, etc.) utilizando los ensayos descritos en la presente divulgación.

[00617] CUADRO 12

DIANA	SEQ ID NO	LÍNEA CELULAR DE CONTROL	LÍNEA CELULAR DIANA	CAM BIO DE PLIEGUES	DIANA	SEQ ID NO	LÍNEA CELULAR DE CONTROL	LÍNEA CELULAR DIANA	CAMB IO DE PLIEGUES
TAJ	32169	293FT	LNCaP	4.35	CD19	32150	Jurkat	RAJI	903
CD22	416	K562	RAJI	4.32	CD19	33431	Jurkat	RAJI	933
DLL3	420	K562	NCI-H82	1.70	CD19	32151	Jurkat	RAJI	270
STEAP2	19814	K562	LNCaP	27.37	CD19	32199	Jurkat	RAJI	117
IL23R	32185	K562	L363	2.37	CD19	32202	Jurkat	RAJI	160
BCMA	32197	K562	H929	2.57	CD33	32205	Jurkat	HL60	17
BCMA	32198	K562	H929	2.99	CD33	32206	Jurkat	HL60	28
CD20	32195	K562	RAJI	15.58	BCMA	32204	Jurkat	L363	2.
MSLN	32208	Jurkat	SKOV3	11.52					

[00618] Inducción de la expresión de GFP impulsada por el promotor NFAT. Las células Jurkat-NFAT-GFP (JNG) se infectan con vectores lentivirales que codifican diferentes construcciones SAR y se seleccionan opcionalmente con puromicina. Las células JNG de control y las células JNG que expresan SAR se cocultivan durante aproximadamente 24 horas

con diferentes líneas celulares diana que expresan su(s) antígeno(s) afín(es). Así, las células JNG que expresan SAR dirigidos a CD19 se cocultivan con la línea celular RAJI que expresa el antígeno CD19 y su capacidad para unirse al antígeno diana e inducir la señalización celular se evalúa midiendo la inducción de la expresión de GFP mediante citometría de flujo. En algunos casos se utilizan células RAJI carentes de CD19 (RAJI-CD19-KO) como controles negativos. La inducción de la expresión de GFP se cuantifica como 1+, 2+, 3+, etc. dependiendo del % de células que expresan SAR que inducen GFP sobre las células control. Así, 1.6+ significa que aproximadamente el 16% de las células JNG que expresan el SAR mostraron inducción de GFP tras el cocultivo con las células diana por encima del nivel observado con las células parentales JNG de control. En algunos casos, las células se pulsan con los péptidos indicados. Los resultados de la siguiente **Tabla 13** demuestran la activación de la expresión de GFP inducida por NFAT tras la expresión de diferentes construcciones de SAR de cadena simple y doble. Estos resultados demuestran que varias construcciones HC-SAR (SAR) dirigidas a diferentes antígenos son altamente activas en el ensayo NFAT-GFP. Estos constructos comprenden diferentes dominios de unión a antígenos y una o dos cadenas híbridas. Además, difieren en los tipos de cadenas híbridas y en la localización de la unión entre las dos cadenas que componen la cadena híbrida. Los resultados demuestran además que la capacidad de HC-SAR para activar NFAT no se limita a las construcciones que comprenden fragmentos vL y vH, sino que también se observa en construcciones que comprenden diferentes tipos de dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, vHH, DARPIN, etc.). Además, las construcciones HC-SAR biespecíficas y multiespecíficas son activas (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32851-76).

[00619] TABLA 13

SEQ ID NO (DNA)	TIPO SAR	Antígeno Diana	Inducción de NFAT-GFP en la Línea Celular Diana
981	SIR	MSLN	SKOV-3 5+
982	FcRySIR	CD19	RAJI 4.5+
983	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-pep 3+
984	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido 3+
985	zSAR	NYESO-1/MAGE-A3/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido 1.5+
986	zSAR	BCMA; NYESO-1/HLA-A2	T2 +, T2 + 10µM NYESO-péptido+
987	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido 6+
988	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido 6,5+,
989	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido 7+
991	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido 2,5+,
992	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido 6+
993	COCHE	CD19	RAJI 4.5+

994	zSIR	CD19	RAJI 1.5+
995	SIR	PSMA	LnCaP 4,5+, MDA-PCa-2b 3+
996	zSIR	CD19	RAJI 6+
997	zSAR	NYESO-0/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido 1.5+
998	zSAR	CD19	RAJI 6+
999	zSIR	CD19	RAJI 2.5+
1000	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 1µM NYESO-péptido 2+
1001	ySIR	CD19	RAJI 4.5+
1002	zSIR	CD19	RAJI 2+
1003	zSIR	CD19	RAJI +
1004	zSIR	CD19	RAJI 3+
1005	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 1µM NYESO-péptido 2+
1006	zSIR	CD19	RAJI 3+
1007	zSIR	CD19	RAJI 3+
1008	zSIR	CD19	RAJI +
1010	zSIR	CD19	RAJI 2.5+
1012	zSIR	CD19	RAJI + DMSO 1,5+, RAJI + 1µM Pom + / -, RAJI + 10µM Len + / -
1013	COCHE	CD70	A-704 3+, 786-O 2,5+, ACHN 1,5+, THP-1 -ve
1014	COCHE	CD72	RAJI +
1015	SIR	KLK2	LnCaP + / -, MDA-PCa-2b -ve
1016	SIR	KLK2	LnCaP + / -, MDA-PCa-2b -ve
1018	zSIR	PSMA	LnCaP +
1019	zCD16-SIR	PSMA	LNCaP +
1020	zSIR	PSMA	LnCaP + / -
1021	zSIR	MSLN	SKOV-3 + / -
1023	zSIR	MSLN	SKOV-3 +
1024	zSIR	CD19	RAJI +
1025	zSIR	CD19	RAJI +
1026	zSIR	CD19	RAJI +
1027	zSIR	CD19	RAJI 2+
1028	zSIR	CD19	RAJI +
1029	zSIR	CD19	RAJI 1.5+
1030	zSIR	CD19	RAJI + / -
1031	zSIR	CD19	RAJI + DMSO +, RAJI + 1µM Pom + / -, RAJI + 10µM Len + / -
1032	zSIR	CD19	RAJI 2+
1033	zSIR	CD19	RAJI 2+
1038	SIR	CD20, CD19, CD72	RAJI 3+
1039	SIR	BCMA, CD19, CD72	RAJI + / -, L363 + / -, U266 + / -
1040	zSIR	CD19	RAJI + DMSO 2,5+, RAJI + 100 nM dTAG 1,5+
1041	zSIR	CD19	RAJI + DMSO 3+, RAJI + 1µM Pom 1,5+, RAJI + 10µM Len 2+.
1042	zSIR	CD19	RAJI + DMSO 3,5+, RAJI + 1µM Pom 3+, RAJI + 10µM Len 3+.
1043	zSIR	MPL	HEL + / -
1044	zSIR	DART1	L428 1.5+
1045	zSIR	CD123	L428 + / -

1046	zSIR	CD19	RAJI 3.5+
1047	zSIR	CD19	RAJI 2.5+
1048	zSIR	CD19	RAJI 4+
1049	zSIR	CD19	RAJI +
1050	zSIR	CD19	RAJI 4+
1051	zSIR	CD19	RAJI 3+
1052	zSIR	CD19	RAJI 3+
1053	zSIR	CD19	RAJI 3.5+
1054	zSIR	CD19	RAJI 3.5+
1055	zSIR	CD19	RAJI 2+
1056	zSIR	CD19	RAJI 4+
1057	zSIR	CD19	RAJI 4+
1058	zSIR	CD19	RAJI 3.5+
1059	zSIR	CD19	RAJI 3.5+
1060	zSIR	CD19	RAJI 3+
1061	SIR	PSMA	LnCaP 2+, MDA-PCa-2b 2+
1062	HC-SAR	CD19	RAJI 4+
1063	HC-SAR	CD19	RAJI 2+
1064	HC-SAR	CD19	RAJI 3.5+
1065	HC-SAR	CD19	RAJI 3.5+
1066	HC-SAR	CD19	RAJI 3+
1067	zSIR	CD19	RAJI 1.5+
1068	zSIR	CD19	RAJI 2+
1069	zSIR	CD19	RAJI +
1070	SIR	CD72, CD19	RAJI +
1071	SIR	CD72, CD19	RAJI 2+
1072	SIR	p53/HLA-A2	T2 +/-, T2-p53WT + / -, T2-p53R175H 1,5+
1073	SIR	CD70	THP-1 +, A-704 7+, 786-O 4+, ACHN 4.5+
1074	zSIR	CD70	THP-1 +, A-704 6+, 786-O 4+, ACHN 3+
1075	zSIR	CD70	THP-1 +, A-704 6,5+, 786-O 4+, ACHN 4+, K562 -ve
1076	zSIR	CD70	THP-1 + / -, A-704 5+, 786-O 2.5+, ACHN 3+,
1077	zSIR	CD70	THP-1 +, A-704 3. 5+, 786-O 1.5+, ACHN 2.5+,
1078	zSIR	CD19	RAJI 1.5+
1079	zSIR	CD19	RAJI 1.5+
1080	zSIR	CD19	RAJI + / -
1081	FcyR-SIR	CD19	RAJI + / -
1082	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido + / -
1083	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido + / -
1084	zSIR	CD19	RAJI +
1085	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10µM NYESO-péptido + / -
1086	FcyR-SIR	CD19	RAJI +
1087	FcyR-SIR	CD19	RAJI 2.5+
1088	zCD16-SIR	PSMA	LnCaP 4+
1089	zSIR	PSMA	LnCaP + / -
1090	zSIR	CD33	Molm-13 + / -, Molm-14 + / -, L428 + / -
1091	zSIR	CD19	RAJI + / -

1092	zSIR	CD19	RAJI 1.5+
1093	SIR	CD19	RAJI-DMSO + / -, RAJI-Pom + / -, RAJI-Len + / -
1094	SIR	CD19	RAJI-DMSO 1.5+, RAJI-dTAG 1.5+
1095	SIR	CD19	RAJI-DMSO 1.5+, RAJI-dTAG 1.5+ ↓
1096	zSIR	CD19	RAJI-DMSO 1.5+, RAJI-Pom + ↓, RAJI-Len + / - ↓
1097	CAR	CLDN-18-2	NUGC-4 + / -, KATOIII + / -
1098	SIR	DLL3, CD19, CD20	RAJI +, NCI-H2171 + / -, NCI-H82 + / -,
1099	SIR	BCMA, CD19, CLDN18-2	RAJI 1.5+, L363 +, U266 +, NUGC-4 + / -
1100	SIR	BCMA, CD19, CD22	RAJI +, L363 +, U266 +
1101	SIR	CD20, CD19, CLDN18-2	RAJI + / -, NUGC-4 + / -, KATOIII + / -
1102	SIR	CD22, CD19, CD20	RAJI 1.5+
22695	CAR	CD70	A-704 +, ACHN +, 786-O +
22696	CAR	CD70	A-704 +/-, ACHN +/-, 786-O +/-
22697	CAR	CD70	A-704 +/-, ACHN +/-, 786-O +/-
22698	SIR	CD70	A-704 +, ACHN +, 786-O +
22699	zSIR	CD70	A-704 +/-, ACHN +/-, 786-O +/-
22700	SIR	BCMA, DLL3, CD19	RAJI +, RAJI-CD19-KO +, RAJI-CD20-KO +, L363 +, U266 +, NCI-H82 +/
22701	SIR	DLL3, CD19, CD20	RAJI +, RAJI-CD19-KO +, NCI-H82 +/-, SHP-77 +/-, SK-MEL5 +/-
22703	zCD16-SIR	PSMA	LnCaP +/-
22704	zSIR	PSMA	LnCaP +/-
22705	SIR	CD19	RAJI 3+, RAJI +10 µM Clorpromazina 2+,
22706	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10 µM NYESO-péptido +/-
22707	zSAR	NYESO-1/HLA-A2	T2 -ve, T2 + 10 µM NYESO-péptido +/-
22708	SIR	CD30, CD19, CD72	RAJI +/-, L428 +/-
22709	COCHE	CD19	RAJI 4+, RAJI +10 µM Clorpromazina 3+, RAJI +10 µM Nifedipino 3,5+
22710	SIR	CD22, CD19, CD20	RAJI +, RAJI-CD19-KO 1,5+, RAJI-CD20-KO 1,5+, RAJI-CD22-KO 1,5+, RAJI-CD19-CD22-KO 1,5+,
22711	zSIR	GD2	SH-Sy5y +/-, SK-MEL-5 -ve, A375 -ve
22712		GD2	SH-Sy5y +, SK-MEL-5 +/-, A375 +/-
22713	zSIR	GD2	SH-Sy5y +/-, SK-MEL-5 -ve, A375 -ve
22714	zCD16-SIR	GD2	SH-Sy5y +, SK-MEL-5 -ve, A375 -ve
22715	zCD16-SIR	GD2	SH-Sy5y +, SK-MEL-5 +/-, A375 +/-
22716	SIR	GD2	SH-Sy5y +, SK-MEL-5 +/-, A375 -ve
22717		CD19	RAJI +
22718	CD16-SAR	CD19	RAJI 1.5+
22719	SIR	CD20, CD19	RAJI 1.5+, RAJI-CD19-KO 2+, RAJI-CD20-KO 2+, RAJI-CD19-CD20-KO +/-
22720	zSIR	CLDN-18-2	NUGC-4 + / -, KATOIII + / -
22721	SIR	CD22, CD19, BCMA	RAJI 3+, RAJI-CD19-KO 2+, RAJI-CD20-KO 2+, RAJI-CD19-CD20-KO 2+, L363 3.5+, U266 3+
22722	zSIR	CD22, CD19	RAJI 3+, RAJI-CD19-KO +, RAJI-CD22-KO 2+, RAJI-CD19-CD22-KO 1,5+
22723	zSIR	CD22, CD19	RAJI 3+, RAJI-CD19-KO +, RAJI-CD22-KO 1,5+, RAJI-CD19-CD22-KO 1,5+

22724	zSIR	CD22, CD19, BCMA	RAJI +, RAJI-CD19-KO +/-, RAJI-CD22-KO +/-, RAJI-CD19-CD22-KO +/-, L363 -ve, U266 +/-
22725	zSIR	CD22, CD19, CD20	RAJI 2+, RAJI-CD19-KO 1,5+, RAJI-CD20-KO 1,5+, RAJI-CD22-KO 2+, RAJI-CD19-CD22-KO 1,5+
22726	zSIR	CD123	L428 +/-, Molm-13 +/-
22727	zSIR	CD123	L428 +/-, Molm-13 +/-
22728	zSIR	CD123	L428 2+ Molm-13 +/-
22729	zCD16-SIR	CD123	L428 2.5+ Molm-13 +
22730	zSIR	CD123	L428 2+ Molm-13 +
22731	zSIR	CD123	L428 +/-, Molm-13 +/-
22732	zCD16-SIR	CD123	L428 3+ Molm-13 +
22733	HC-SAR	CD123	L428 +/-, Molm-13 -ve
32428	SIR	BCMA	L363 (+1), MM1S (+1), OPM2 (+1,5)
32429	SIR	BCMA	L363 (+/-), MM1S (+1), OPM2 (+/-)
32430	SIR	BCMA	L363 (+/-), MM1S (+/-), OPM2 (+/-)
32431	SIR	BCMA	L363 (+/-), MM1S (+1,5)
32432	SIR	BCMA	L363 (+1), MM1S (+2,5), OPM2 (+1,5)
32433	SIR	BCMA	L363 (+/-), MM1S (+/-), OPM2 (+/-)
32434	SIR	BCMA	L363 (+/-), Daudi (+/-), RPMI-8266 (+/-), NCI-H929 (+/-)
32437	SIR	BCMA	L363 (+/-), MM1S (+/-), OPM2 (+/-), Daudi (+/-),
32438	SIR	BCMA	L363 (+/-), MM1S (+/-), OPM2 (+/-), RPMI-8266 (+/-)
32439	SIR	BCMA	MM1S (+1), OPM2 (+/-), Daudi (+/-), RPMI-8266 (+1)
32441	SIR	BCMA	RAJI (+4), NCI-H929 (+1), L363 (+3), MM1S (+4,5), RPMI-8226 (+5)
32442	zSIR	BCMA	NCI-H929 (+/-), MM1S (+/-), RPMI-8226 (+/-)
32443	zCD16-SAR	BCMA	MM1S (+1), L363 (+/-), U266 (+/-), RPMI-8226 (+/-)
32444	z16SIR	BCMA	NCI-H929 (+1), MM1S (+1), RPMI-8226 (+1)
32445	z16SIR	BCMA	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-). MM1S (+2), RPMI-8226 (+1)
32446	HC-SAR	BCMA	MM1S (+2), NCI-H929 (+2), L363 (+1,5), U266 (+2), RPMI-8226 (+2)
32448	SIR	CD19	RAJI (+4)
32449	SIR	CD19	RAJI (+1)
32450	SIR	CD19	RAJI (+3)
32451	SIR	CD19	RAJI (+3)
32452	SIR	CD19	RAJI (+/-)
32453	SIR	CD19	RAJI (+4)
32454	SIR	CD19	RAJI (+4)
32455	SIR	CD19	RAJI (+2)
32456	SIR	CD19	RAJI (+2)
32457	SIR	CD19	RAJI (+1,5)
32458	SIR	CD19	RAJI (+2)
32459	SIR	CD19	RAJI (+2)
32460	SIR	CD19	RAJI (+2)
32461	SIR	CD19	RAJI (+1,5), RAJI-CD19-KO (-)
32462	SIR	CD19	RAJI (-), RAJI-CD19-KO (-)
32463	SIR	CD19	RAJI (+2)
32464	SIR	CD19	RAJI (+/-)

32465	SIR	CD19	RAJI (+2,5)
32466	SIR	CD19	RAJI (+2,5)
32467	SIR	CD19	RAJI (+2,5)
32468	SIR	CD19	RAJI (+2)
32469	SIR	CD19	RAJI (+3,5)
32470	SIR	CD19	RAJI (+2,5)
32471	SIR	CD19	RAJI (+1)
32472	SIR	CD19	RAJI (+1)
32473	SIR	CD19	RAJI (+/-)
32474	SIR	CD19	RAJI (+2,5)
32475	SIR	CD19	RAJI (+6,5)
32476	SIR	CD19	RAJI (+5)
32477	CAR	CD19	RAJI (+2,5)
32478	CAR	CD19	RAJI (+2,5)
32479	CAR	CD19	RAJI (+2,5)
32480	CAR	CD19	RAJI (+/-)
32481	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32482	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32483	zSIR	CD19	RAJI (+1,5)
32484	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32485	zSIR	CD19	RAJI (+6)
32486	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32487	zSIR	CD19	RAJI (+2,5)
32488	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32489	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32490	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32491	zSIR	CD19	RAJI (+2,5)
32492	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32493	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32494	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32495	zSIR	CD19	RAJI (+1,5)
32496	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32497	zSIR	CD19	RAJI (-)
32498	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32499	zSIR	CD19	RAJI (+1,5)
32500	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32501	zSIR	CD19	RAJI (+1,5)
32502	zSIR	CD19	RAJI (+1,5)
32503	zSIR	CD19	RAJI (+2)
32504	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32505	zSIR	CD19	RAJI (+2)
32506	zSIR	CD19	RAJI (+1,5)
32507	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32508	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32509	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32510	zSIR	CD19	RAJI (+2)
32511	zSIR	CD19	RAJI (+/-)

32512	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32513	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32514	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32515	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32516	zSIR	CD19	RAJI 2+
32517	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32518	zSIR	CD19	RAJI (+3)
32519	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32520	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32521	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32522	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32523	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32524	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32525	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32526	zSIR	CD19	RAJI (+1,5)
32527	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32528	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32529	zSIR	CD19	RAJI (+2)
32530	zSIR	CD19	RAJI (+1)
32531	zSIR	CD19	RAJI (+/-)
32532	zSIR	CD19	RAJI (+5)
32533	zSIR	CD19	RAJI (+2,5)
32534	zSIR	CD19	RPMI-8226 (-), RAJI (+/-)
32535	zSIR	CD19	RAJI (+4,5)
32536	zSIR	CD19	RAJI (+2,5)
32537	zSIR	CD19	RAJI (+2,5)
32540	z16SIR	CD19	RAJI (+5)
32541	z16SIR	CD19	RAJI (+1,5)
32542	z16SIR	CD19	RAJI (+2)
32543	z16SIR	CD19	RAJI (+2)
32544	z16SIR	CD19	RAJI (+1,5)
32545	z16SIR	CD19	RAJI (+2)
32546	z16SIR	CD19	RAJI (+1,5)
32547	z16SIR	CD19	RAJI (+3)
32548	z16SIR	CD19	RAJI (+1,5)
32549	z16SIR	CD19	RAJI (+3)
32550	z16SIR	CD19	RAJI (+1)
32551	HC-SAR	CD19	RAJI (+1,5)
32552	HC-SAR	CD19	RAJI (+1)
32553	HC-SAR	CD19	RAJI (+1,5)
32554	HC-SAR	CD19	RAJI (+2,5)
32555	HC-SAR	CD19	RAJI (+2)
32556	HC-SAR	CD19	RAJI (+2,5)
32557	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32558	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32559	HC-SAR	CD19	RAJI (+1)
32560	HC-SAR	CD19	RAJI (+1)

32561	HC-SAR	CD19	RAJI (+1)
32562	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32563	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32564	HC-SAR	CD19	RAJI (+2)
32565	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32566	HC-SAR	CD19	RAJI (+1)
32567	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32568	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32569	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32570	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32571	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32572	HC-SAR	CD19	RAJI (+2)
32573	HC-SAR	CD19	RAJI (+2)
32574	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32575	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32576	HC-SAR	CD19	RAJI (+1,5)
32577	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32578	HC-SAR	CD19	RAJI (+1,5)
32579	HC-SAR	CD19	RAJI (+1)
32580	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32581	HC-SAR	CD19	RAJI (+2,5)
32582	HC-SAR	CD19	RAJI (+2,5)
32583	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32584	HC-SAR	CD19	RAJI (+4)
32585	HC-SAR	CD19	RAJI (+1,5)
32586	HC-SAR	CD19	RAJI (+3)
32587	HC-SAR	CD19	RAJI (+4)
32588	HC-SAR	CD19	RAJI (+1,5)
32589	HC-SAR	CD19	RAJI (+2)
32590	HC-SAR	CD19	RAJI (+2,5)
32591	HC-SAR	CD19	RAJI (+1,5)
32592	HC-SAR	CD19	RAJI (+3,5)
32593	HC-SAR	CD19	RAJI (+1)
32594	HC-SAR	CD19	RAJI (+2)
32595	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32596	HC-SAR	CD19	RAJI (+1,5)
32597	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
32598	HC-SAR	CD19	RAJI (+1)
32599	HC-SAR	CD19	RAJI (+2)
32600	LINK CAR	CD19	RAJI (+2)
32601	LINK CAR	CD19	RAJI (+1,5)
32602	LINK CAR	CD19	RAJI (+1)
32603	LINK CAR	CD19	RAJI (+/-)
32604	LINK CAR	CD19	RAJI (+1,5)
32605	LINK CAR	CD19	RAJI (+3)
32606	LINK CAR	CD19	RAJI (+2)
32607	LINK CAR	CD19	RAJI (+2), Jeko1 (+1,5)

32608	LINK CAR	CD19	RAJI (+/-)
32609	LINK CAR	CD19	RAJI (+/-)
32610		CD19	RAJI (+/-)
32613	SIR	CD22	SKOV3 (+/-), OVCAR3 (+1,5)
32618	z16SIR	CD70	A-704 (+/-), ACHN (-), 786-O (+/-)
32619	SIR	CD79b	RAJI (+1,5), Jeko1 (+2,5)
32620	SIR	CD79b	RAJI (+/-), Jeko1 (-)
32621	SIR	CD79b	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-)
32622	zSIR	CD79b	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-)
32623	HC-SAR	CD79b	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-)
32624		CD123	L428 (+/-)
32625	SIR	CD123	MOLM-13 (+/-), L428 (+/-)
32626	SIR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+1)
32627	SIR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+1)
32628	SIR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+1)
32629	SIR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+/-)
32630	SIR	CLD18A2	KATOIII (+1), NUGC4 (+/-)
32631	SIR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+/-)
32632	SIR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+/-)
32633	SIR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+/-)
32634	SIR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+1)
32635	SIR	CLD18A2	KATOIII (+1), NUGC4 (+1)
32636	SIR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+1)
32637	SIR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+/-)
32638	CAR	CLD18A2	KATOIII (+/-), NUGC4 (+1,5)
32639	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+/-), OV90 (+/-), HepG2 (+/-),
32640	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+3), OV90 (+1)
32641	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+2), OV90 (+2)
32644	SIR	CLDN6	OVCAR3 (-), OV90 (+/-)
32645	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+1,5), OV90 (+1)
32646	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+1), OV90 (+1)
32647	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+1,5), OV90 (+1)
32650	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+1,5), OV90 (+/-),
32652	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+2,5), OV90 (+2,5)
32653	SIR	CLDN6	SKOV3 (+/-),
32654	SIR	CLDN6	SKOV3 (-), OVCAR3 (+/-),
32655	SIR	CLDN6	SKOV3 (-), OVCAR3 (+/-), OV90 (+/-),
32656	SIR	CLDN6	SKOV3 (-), OVCAR3 (+/-), OV90 (+/-)
32657	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+2,5), OV90 (+1)
32658	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+3), OV90 (+1,5)
32660	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+3), OV90 (+/-)
32661	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+1,5), OV90 (+1)
32662	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+4,5), OV90 (+2,5)
32663	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+1), OV90 (+1)
32664	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+4), OV90 (+2)
32665	CAR	CLDN6	SKOV3 (-), OVCAR3 (+/-), OV90 (+/-),
32666	CAR	CLDN6	OVCAR3 (+1,5), OV90 (+1,5)

32667	CAR	CLDN6	OVCAR3 (+/-), OV90 (+/-), SKOV3 (-)
32669	CAR	CLDN6	OVCAR3 (+1), OV90 (+/-), SKOV3 (-)
32670	CAR	CLDN6	OVCAR3 (+/-), OV90 (+/-), SKOV3 (-)
32671	SIR	EGFRviii	A431 (+/-), HeLa (-), Hela-EGFR (-)
32672	SIR	EGFRviii	A431 (+/-), HeLa (-), Hela-EGFR (-)
32673	CAR	EGFRviii	A431 (+1,5), HeLa (+1), Hela-EGFR (+1)
32674	HC-SAR	FR1	SKOV3 (+3,5), OVCAR3 (+6)
32675	SIR	GD2	A375 (-), SH-SY5Y (+/-) SK-MEL-5 (+/-)
32676	SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (+1) SK-MEL-5 (+1,5)
32678	SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (-) SK-MEL-5 (+/-)
32679	SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (+/-) SK-MEL-5 (+/-)
32680	SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (+/-) SK-MEL-5 (+/-)
32681	SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (+/-) SK-MEL-5 (+/-)
32682	SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (+1) SK-MEL-5 (-)
32683	SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (+/-) SK-MEL-5 (+/-)
32684	SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (+1) SK-MEL-5 (+1)
32685	SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (+1,5) SK-MEL-5 (+1)
32686	SIR	GD2	A375 (+1), SH-SY5Y (+2) SK-MEL-5 (+1,5)
32687	zSIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (-) SK-MEL-5 (+1)
32688	z16SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (+1) SK-MEL-5 (+/-)
32689	z16SIR	GD2	A375 (-), SH-SY5Y (+/-) SK-MEL-5 (+/-)
32690	z16SIR	GD2	A375 (-), SH-SY5Y (+/-) SK-MEL-5 (+/-)
32691	z16SIR	GD2	A375 (+/-), SH-SY5Y (+1) SK-MEL-5 (-)
32692	z16SIR	GD2	A375 (-), SH-SY5Y (+/-) SK-MEL-5 (-)
32693	HC-SAR	GD2	A375 (-), SH-SY5Y (+/-) SK-MEL-5 (-)
32694	z16SIR	GPC3	HepG2 (-), Hutu-80 (+/-), Huh7 (-)
32696	z16SIR	GPC3	HepG2 (-), Hutu-80 (+1), Huh7 (+/-)
32697	z16SIR	GPC3	HepG2 (+/-), Hutu-80 (-), Huh7 (-)
32698	z16SIR	GPC3	HepG2 (-), Hutu-80 (-), Huh7 (+1)
32699	z16SIR	GPC3	HepG2 (+/-), Hutu-80 (-), Huh7 (-)
32700	SIR	GPRC5D	L363 (+/-), MM1S (+1), OPM2 (+/-)
32701	SIR	GPRC5D	L363 (-), MM1S (+/-), OPM2 (-), Daudi (-), RPMI-8266 (+/-),
32702	zSIR	GPRC5D	OPM2 (+/-), Daudi (+/-), RPMI-8266 (+/-)
32703	SIR	HER2	SKOV3 (+/-), OVCAR3 (+1)
32704	SIR	HER2	SKOV3 (+/-), OVCAR3 (-)
32705	SIR	HLA-A2-SANG	U266 (+2), Bv173 (+2)
32706	SIR	HLA-A2-SANG	U266 (+/-), Bv173 (+/-)
32707	CAR	HLA-A2-SANG	U266 (+1,5), Bv173 (+2)
32708	CAR	HLA-A2-SANG	U266 (+1,5), Bv173 (+2)
32709	SIR	IL13Ra2	SKOV3 (+/-), U87MG (+/-)
32710	SIR	IL13Ra2	SKOV3 (-), U87MG (+/-)
32711	SIR	IL13Ra2	SKOV3 (-), U87MG (+1)
32712	CAR	IL23R	DLD-1 (+2), HT29 (+2), L363 (-), U266 (+/-)
32714	SIR	Muc16	OVCAR3 (+/-), OV90 (+/-), SKOV3 (-)
32715	SIR	MUC16	SKOV3 (-), OVCAR3 (+/-)
32716	SIR	MSLN	SKOV3 (+1,5), OVCAR3 (+3,5), OV90 (-)

32717	zSIR	MSLN	SKOV3 (+/-)
32718	HC-SAR	MSLN	SKOV3 (+2), OVCAR3 (+3)
32719	HC-SAR	MSLN	SKOV3 (+3,5), OVCAR3 (+5,5)
32720	HC-SAR	MSLN	SKOV3 (+3), OVCAR3 (+4)
32722	zSIR	p53	T2 (+/-), T2 + p53-WT (+/-), T2+ p53 R175 (+3)
32723	zSIR	p53	T2 (+/-), T2 + p53-R175 (+2), T2 + p53-WT (+/-)
32724	z16SIR	p53	T2 (+/-), T2 + p53-R175 (+4), T2 + p53-WT (+/-)
32725	z16SIR	p53	T2 (+/-), T2 + p53-R248Q (+/-)
32726	z16SIR	p53	T2 (+/-), T2 + p53-R175 (+4), T2 + p53-WT (+/-)
32727	z16SIR	p53	T2 (+/-), T2 + p53-R248Q (+/-)
32728	z16SIR	p53	T2 (+/-), T2 + p53-R175 (+2), T2 + p53-WT (+/-)
32729	z16SIR	p53	T2 (+/-), T2 + p53-R248Q (+/-)
32730	SIR	PSCA	NCI-H1993 (+/-)
32731	SIR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+/-)
32732	SIR	PSCA	NCI-H1993 (+1,5), NCI-H2126 (+1), NUGC-4 (-)
32733	SIR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+1)
32734	SIR	PSCA	NCI-H1993 (+1)
32735	zSIR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (-)
32736	z16SIR	PSCA	NCI-H1993 (+1), NCI-H2126 (+1), NUGC-4 (-)
32737	z16SIR	PSCA	NCI-H1993 (+/-)
32738	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+/-)
32739	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-)
32740	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-)
32741	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (-)
32742	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (-)
32743	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+/-)
32744	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+/-)
32745	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+/-)
32746	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+/-)
32747	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+/-)
32748	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+/-)
32749	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+/-)
32750	HC-SAR	PSCA	NCI-H1993 (+/-), NCI-H2126 (+/-)
32752	zSIR	PSMA	LNCaP (+2)
32753	zSIR	PSMA	LNCaP (+1)
32754	zSIR	PSMA	LNCaP (+1,5)
32755	zSIR	PSMA	LNCaP (+1)
32756	zSIR	PSMA	LNCaP (+3)
32757	zSIR	PSMA	LNCaP (+1,5)
32758	zSIR	PSMA	LNCaP (+3,5)
32759	zSIR	PSMA	LNCaP (+2)
32760	zSIR	PSMA	LNCaP (+1,7)
32761	zSIR	PSMA	LNCaP (+2,1)
32762	zSIR	PSMA	LNCaP (+1,5)
32763	zSIR	PSMA	LNCaP (+3,5)
32764	z16SIR	PSMA	LNCaP (+4)
32765	z16SIR	PSMA	LNCaP (+2,5)

32766	z16SIR	PSMA	LNCaP (+2,2)
32767	z16SIR	PSMA	LNCaP (+1,7)
32768	z16SIR	PSMA	LNCaP (+3)
32769	z16SIR	PSMA	LNCaP (+5)
32770	z16SIR	PSMA	LNCaP (+2,5)
32771	z16SIR	PSMA	LNCaP (+1,5)
32772	z16SIR	PSMA	LNCaP (+2,5)
32773	zSIR	ROR1	Jeko1 (+/-)
32774	z16SIR	ROR1	Jeko1 (+/-)
32775	z16SIR	ROR1	Jeko1 (+/-)
32776	z16SIR	ROR1	Jeko1 (+/-)
32777	HC-SAR	ROR1	Jeko-1 (+/-)
32778	HC-SAR	ROR1	Jeko1 (+/-)
32779	SIR	STEAP2	LNCaP (+1)
32780	SIR	STEAP2	LNCaP (+3)
32781	SIR	STEAP2	LNCaP (+/-)
32782	z16SIR	STEAP2	LNCaP (+/-)
32783	z16SIR	STEAP2	LNCaP (+/-)
32784	z16SIR	STEAP2	LNCaP (+/-)
32785	HC-SAR	STEAP2	LNCaP (+/-)
32786	HC-SAR	STEAP2	LNCaP (+/-)
32787	SIR	GPRC5D-BCMA	L363 (+/-), MM1S (+/-) RPMI-8266 (+2,5),
32788	SIR	GPRC5D-BCMA	L363 (+1,5), MM1S (+2), Daudi (+1,5), RPMI-8266 (+2,5), NCI-H929 (+2)
32790	SIR	BCMA-CD20	L363 (+/-), MM1S (+/-), OPM2 (+/-), RPMI-8266 (+1),
32791	SIR	CLD18A2-CD20	KATOIII (+/-), NUGC4 (+/-)
32792	SIR	CLD18A2-CD20	KATOIII (+/-), NUGC4 (+/-)
32793	SIR	BCMA-CLD18A2	NCI-H929 (-), MM1S (+/-), RPMI-8226 (-), KATOIII (-)
32794	SIR	BCMA-CLD18A2	MM1S (+1), RPMI-8226 (-),
32795	SIR	BCMA-CLD18A2	U266 (+/-), NCI-H929 (-), MM1S (+1,5), NUGC4 (+/-)
32796	SIR	BCMA-CD20	MM1S (+/-), RPMI-8226 (-)
32798	SIR	CD20-CD19	U266 (+1), NCI-H929 (+1), MM1S (+1,5), RAJI (+1)
32799	SIR	CD20-CD19	RAJI (+1)
32800	SIR	CD20-CD19	RAJI (+1,5)
32801	SIR	MSLN-MUC16	SKOV3 (+1,5), OVCAR3 (+3), OV90 (-)
32802	SIR	CD19-MUC16	SKOV3 (+/-), OVCAR3 (-), OV90 (-), RAJI(+/-)
32803	SIR	CD19-MUC16	SKOV3 (-), OVCAR3 (-), OV90 (-), RAJI(+/-)
32804	SIR	MUC16-MSLN	SKOV3 (+/-), OVCAR3 (+2,5), OV90 (-)
32805	SIR	CD20-CD19	RAJI (+5)
32806	SIR	IL13Ra2-CD19	RAJI (+5,5), U87MG (+1,5)
32807	SIR	IL13Ra2-CD19	RAJI (+6,5), U87MG (+2)
32808	SIR	CD19-BCMA	RAJI (+5), MM1S (+1), RPMI-8226 (+2)
32809	SIR	CD19-BCMA	RAJI (+4), NCI-H929 (+1), MM1S (+1), RPMI-8226 (+2)
32810	SIR	GPRC5D-BCMA	RAJI (+1), NCI-H929 (+1), L363 (+1), MM1S (+1), RPMI-8226 (+1)
32811	SIR	GPRC5D-BCMA	RAJI (+5), NCI-H929 (+1), L363 (+3), MM1S (+4), RPMI-8226 (+1)

32812	SIR	GPRC5D-BCMA	RAJI (+5), NCI-H929 (+1), L363 (+2), MM1S (+4), RPMI-8226 (+4,5)
32813	SIR	MUC16-MSLN	SKOV3 (+1,5), OVCAR3 (-)
32814	SIR	BCMA-CD19	RAJI (+/-), L363 (-), U266 (-)
32815	SIR	CD20-CD19	Jeko1 (+/-), RAJI (+2)
32816	SIR	CD20-CD19	Jeko1 (+/-), RAJI (+2)
32817	SIR	CD20-CD19	Jeko1 (+/-), RAJI (+3)
32818	SIR	BCMA-CD19	RAJI (+1,5), L363 (+/-), NCI-H929 (+/-), MM1S (+/-)
32819	SIR	BCMA-CD19	RAJI (+/-), NCI-H929 (+/-), MM1S (+/-)
32820	SIR	BCMA-CD19	RAJI (+/-), L363 (+/-), U266 (-), NCI-H929 (+/-)
32821	SIR	BCMA-CD19	RAJI (+/-), L363 (+/-), U266 (-), NCI-H929 (+/-),
32822	SIR	CD20-CD19	RAJI (+1,5), Jeko1 (+/-)
32823	SIR	CD20-CD19	RAJI (+1), Jeko1 (+1)
32824	SIR	CD79b-CD20	RAJI (+1), Jeko1 (+/-)
32825	SIR	CD79b-CD20	RAJI (+2), Jeko1 (+2)
32826	SIR	CD79b-BCMA	RAJI (+2,5), Jeko1 (+2,5), L363 (+2,5), NCI-H929 (+3), MM1S (+3), RPMI-8226 (+3,5)
32827	SIR	CD22-CD20	RAJI (+3,5), Jeko1 (+1,5)
32828	SIR	CD19-BCMA	RAJI (+1,5)
32830	zSIR	CD19-CD20	RAJI (+1,5)
32831	zSIR	GPRC5D-BCMA	L363 (+/-), MM1S (+1), OPM2 (+1)
32832	zSIR	GPRC5D-BCMA	L363 (+1), MM1S (+2), OPM2 (+1,5)
32833	zSIR	GPRC5D-BCMA	L363 (+/-), MM1S (+1,5), OPM2 (+1)
32835	zSIR	GPRC5D-BCMA	MM1S (+1,5), U266 (+/-), RPMI-8266 (+1,5),
32836	zSIR	GPRC5D-BCMA	L363 (+/-), MM1S (+1), U266 (+/-)
32837	zSIR	GPRC5D-BCMA	L363 (+1), NCI-H929 (+1), MM1S (+2)
32838	zSIR	GPRC5D-BCMA	L363 (+/-), U266 (+1), NCI-H929 (+1), MM1S (+1,5)
32839	zSIR	GPRC5D-BCMA	L363 (+1), U266 (+2), NCI-H929 (+1,5), MM1S (+3), RPMI-8226 (+1,5)
32840	zSIR	CD20-CD19	Jeko1 (+1), RAJI (+3)
32841	zSIR	BCMA-CD19	RAJI (+1), L363 (+/-), U266 (-), RPMI-8226 (+/-)
32842	zSIR	CD19-CD20	RAJI (+1,5), Jeko1 (+1)
32845	zSIR	CD19-CD20	RAJI (+1,5), Jeko1 (+1)
32846	zSIR	CD19-CD22	RAJI (+1,5), Jeko1 (+/-)
32847	zSIR	CD19-BCMA	RAJI (+1), Jeko1 (+/-), L363 (+/-), U266 (+1), MM1S (+1)
32848	zSIR	CD19-BCMA	Jeko1 (+/-), L363 (+/-), U266 (+/-), NCI-H929 (+/-)
32849	z16SIR	CD19-CD20	RAJI (+2), Jeko1 (+/-), NCI-H929 (-)
32850	z16SIR	CD19-CD20	RAJI (+2), NCI-H929 (-)
32851	HC-SAR	CD20-CD19	Jeko1 (+1), RAJI (+2)
32852	HC-SAR	CD20-ROR1	Jeko1 (+/-), RAJI (+2)
32853	HC-SAR	CD20-CD19	Jeko1 (+1), RAJI (+2)
32854	HC-SAR	CD19-BCMA	RAJI (+1), Jeko1 (+/-), L363 (-), U266 (-)
32855	HC-SAR	CD19-CD22	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-)
32856	HC-SAR	CD19-CD22	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-)
32857	HC-SAR	CD19-CD22	RAJI (+1), Jeko1 (+/-)
32858	HC-SAR	CD19-CD22	RAJI (+1), Jeko1 (+1)
32859	HC-SAR	CD19-CD22	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-)

32860	HC-SAR	CD19-CD22	RAJI (+1), Jeko1 (+/-)
32861	HC-SAR	CD19-BCMA	RAJI (+1), MM1S (+1,5), RPMI-8226 (+1,5)
32863	HC-SAR	CD19-BCMA	RAJI (+/-), NCI-H929 (+/-), MM1S (+1)
32864	HC-SAR	CD19-BCMA	RAJI (+1), L363 (+1), U266 (+1), NCI-H929 (+1), MM1S (+1)
32865	HC-SAR	CD19-BCMA	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-). L363 (+/-), MM1S (+1),
32866	HC-SAR	CD19-BCMA	RAJI (+/-), NCI-H929 (+/-), MM1S (+/-)
32867	HC-SAR	CD19-BCMA	RAJI (+1), NCI-H929 (+1), MM1S (+1), RPMI-8226 (+1)
32868	HC-SAR	BCMA-CD19	MM1S (+/-), NALM6 (-),
32869	HC-SAR	BCMA-CD19	MM1S (+/-), NALM6 (+/-),
32870	HC-SAR	CD19-PSMA	RAJI (+1)
32871	HC-SAR	CD19-BCMA	RAJI (+1)
32872	HC-SAR	BCMA-CD19	MM1S (+/-), NALM6 (+/-), U87MG (-)
32873	HC-SAR	CD19-PSMA	RAJI (+2)
32874	HC-SAR	CD19-BCMA	RAJI (+1,5)
32875	HC-SAR	CD20-CD19	RAJI (+2), Jeko1 (+/-)
32876	HC-SAR	HER2-CD19	RAJI (+1)
32877	LINK CAR	CD19-CD20	RAJI (+3), Jeko1 (+3)
32878	SIR	CD22-CD19-BCMA	L363 (+/-), MM1S (+1), U266 (+1)
32879	SIR	CD20-CD19-BCMA	L363 (+/-), NCI-H929 (+1), MM1S (+1),RAJI (+/-)
32880	SIR	BCMA-CD19-CD20	MM1S (+1), RPMI-8226 (-), RAJI (-)
32881	SIR	CD20-CD19-BCMA	U266 (+1,5), NCI-H929 (+1,5), MM1S (+1), RPMI-8226 (+1), RAJI (+3,5)
32882	SIR	BCMA-CD20-CD19	NCI-H929 (+/-), RAJI (+1)
32883	SIR	BCMA-CD20-CD19	Jeko1 (+/-), RAJI (+/-)
32884	SIR	BCMA-CD19-CD20	RAJI (+2), Jeko1 (+1,5), NCI-H929 (+1,5), MM1S (+1,5)
32885	SIR	BCMA-CD19-CD20	NCI-H929 (+2), L363 (+2), MM1S (+3), RPMI-8226 (+2,5), U266 (+1,5), RAJI (+2), Jeko1 (+1)
32886	SIR	BCMA-CD20-CD19	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-). MM1S (+/-), RPMI-8226 (+/-)
32887	SIR	BCMA-CD20-CD19	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-). NCI-H929 (+/-)
32888	SIR	BCMA-CD20-CD19	RAJI (+6), NCI-H929 (+1,5), MM1S (+1), RPMI-8226 (+1)
32889	SIR	CD20-BCMA-CD19	RAJI (+6,5)
32890	SIR	CD20-BCMA-CD19	RAJI (+5,5)
32891	SIR	BCMA-CD20-CD19	RAJI (+2,5), NCI-H929 (+2), L363 (+1,5), MM1S (+2), RPMI-8226 (+3)
32892	SIR	BCMA-CD20-CD19	RAJI (+1,5), NCI-H929 (+/-), MM1S (+/-)
32893	SIR	CD20-CD19-MSLN	SKOV3 (-), OVCAR3 (-), Jeko1 (+/-), RAJI (+1,5)
32894	SIR	HER3-HER2-CD19	SKOV3 (-), OVCAR3 (+/-), HeLa (-), RAJI (-)
32895	HC-SAR	BCMA-CD20-CD19	MM1S (+/-), NALM6 (+/-)
32896	HC-SAR	BCMA-CD20-CD19	RAJI (+2,5), Jeko1 (+/-)
40431	HC-SAR	CD19	RAJI-WT (+4)
40432	HC-SAR	CD22-CD19	RAJI-WT (+2), RAJI-CD19-KO (+2), RAJI-CD22-KO (+/-),
40433	HC-SAR	CD22-CD19	RAJI-WT (+3), RAJI-CD19-KO (+3), RAJI-CD22-KO (+/-),
40434	HC-SAR	CD22-CD19	RAJI-WT (+2,5), RAJI-CD19-KO (+2), RAJI-CD22-KO (+/-),

40435	SIR	BCMA-CD22-CD19	RAJI-WT (+1), RAJI-CD19-KO (+1), RAJI-CD22-KO (+1)
40436	SIR	CLD18A2	NUGC4 (+1,5)
40437	SIR	CLDN6	OVCAR3 (+3), OV90 (+3,5)
40438	z16SAR	CD19	RAJI (+/-)
40439	CAR	CD19	RAJI (+/-), HL60 (-)
40440	CAR	CD19	RAJI (+/-), HL60 (-)
40441	CAR	BCMA	RAJI (+2), Nalm6 (-), L363 (+/-), NCI-H929 (+/-)
40442	CAR	CD33	RAJI (-), HL60 (+/-)
40443	CAR	CD33	RAJI (+/-), HL60 (+3)
40444	CAR	CD33	RAJI (-), HL60 (+2)
40445	CAR	CD33	RAJI (+/-), HL60 (+2)
40446	CAR	MSLN	SKOV3 (+3,5), OVCAR3 (+3)
40447	CAR	MSLN	SKOV3 (+3), OVCAR3 (+4)
40448	CAR	CD20	RAJI (+/-), Jeko1 (+/-)
40449	z16SIR	PSMA	LNCaP (+/-)
40450	z16SIR	CD79b	RAJI (+/-), Jeko1 (+1)
40451	COCHE	CD79b	RAJI (+/-), Jeko1 (+1)
40452	HC-SAR	CD19	RAJI (+4)
40453	HC-SAR	CD19	RAJI (+1)
40454	HC-SAR	CD19	RAJI (+1,5)
40455	HC-SAR	CD19	RAJI (+1)
40456	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
40457	LINK z16SIR	BCMA-CD19	RAJI (+2,5), RAJI+Dasatinib (+3,5)
40458	SIR	CD79b	RAJI (+5,5)
40461	HC-SAR	BCMA	MM1S (+3,5)
40463	HC-SAR	CD79b	Jeko1 (+2)
40464	SIR	CD19-CD20	RAJI (+3,5)
40480	SIR	CD79b-CD20	Jeko1 (+1,5)
40481	LINK CAR	CD19	RAJI (+3), RAJI+Dasatinib (+5)
40482	LINK CAR	CD19	RAJI (+4), RAJI+Dasatinib (+4)
40483	LINK CAR	CD19	RAJI (+4), RAJI+Dasatinib (+4)
40484	HC-SAR	CD19	RAJI (+6)
40485	HC-SAR	CD19	RAJI (+5,5)
40486	HC-SAR	CD19	RAJI (+3,5)
40487	HC-SAR	CD19	RAJI (+2,5)
40488	HC-SAR	CD19	RAJI (+3)
40489	SIR	CD19	RAJI (+4)
40490	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
40491	LINK CAR	CD19	RAJI (+3), RAJI+Dasatinib (+3)
40492	LINK CAR	BCMA	MM1S (+1,5), MM1S+Dasatinib (+1,5)
40493	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
40494	HC-SAR	CD19	RAJI (+5)
40495	HC-SAR	CD19	RAJI (+3,5)
40496	HC-SAR	CD19	RAJI (+4,5)
40497	HC-SAR	CD19	RAJI (+/-)
40498	HC-SAR	CD19	RAJI (+4)

40499	HC-SAR	CD19	RAJI (+4,5)
40500	HC-SAR	CD19	RAJI (+5)
40511	CAR	CD79b	Jeko1 (+1,5)
40509	z16SIR	CD79b	Jeko1 (+1,5)

[00620] Los resultados anteriores también demuestran que se pueden construir construcciones SAR uniespecíficas, biespecíficas y triespecíficas funcionales (incluyendo HC-SAR, zSIR, zCD16-SAR o z16 SAR, etc.) utilizando los nuevos dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, vL, vH, scFv y vHH) descritos en la presente divulgación. Estos nuevos dominios de unión a antígeno se dirigen a antígenos tales como CD16, CD20, CD33, CD22, CD70, CD79b, MSLN, STEAP2, CLDN6, CLDN18.2, BCMA, PSCA, GD2, GPRC5D, ROR1, Folate receptor 1, p53 mutante, NY-ESO-1, TAJ, DLL3, KLK2, IL13Ra2, MUC15, HLA-A2, etc.

[00621] Los resultados también demuestran la capacidad de las construcciones zSAR que comprenden mutaciones dQ101 en CD3z para mostrar una señalización eficaz (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32540-50). La construcción con SEQ ID NO: 32550 demuestra que pueden construirse construcciones zSAR funcionales en las que los dominios vL y vH de un anticuerpo se unen a la cadena CD3z mediante enlazadores que comprenden los dominios enlazadores (o constantes) similar a Ig de las cadenas TCR γ y TCR δ .

[00622] Los resultados también demuestran que las construcciones SAR de cadena simple y doble de CD16 que carecen parcial o totalmente del dominio citosólico de CD16 son funcionalmente activas (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32550). Los resultados demuestran además que el dominio citosólico de CD16 en un SAR basado en CD16 de cadena simple o doble puede sustituirse por el dominio citosólico de una molécula coestimuladora (*p.ej.*, 41BB, CD28, etc.) (SEQ ID NO: 32553, 32545). Alternativamente, el dominio coestimulador (*p.ej.*, el dominio coestimulador de 41BB, CD28, etc.) puede unirse al C-terminal o al N-terminal del dominio citosólico de CD16.

[00623] Los resultados también demostraron la actividad de señalización de SAR que comprenden enlazadores derivados de los dominios constantes TCR γ y TCR δ (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32545) y enlazadores largos Ig derivados de cadenas constantes TCR (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32544).

[00624] Los resultados también demuestran varios diseños SIR/SAR novedosos. La construcción con SEQ ID NO: 32532 comprende una construcción en la que el dominio vH de un anticuerpo está unido operativamente mediante un enlazador (*p.ej.*, IgCL) a la bisagra, TM y dominio CP de CD8 y el fragmento vH complementario está unido mediante un enlazador (*p.ej.*, IgG1-CH1) a la bisagra, TM de CD4 y dominio CP de CD3z.

[00625] Los resultados también demostraron que LINK CAR (*p.ej.*, SEQ ID NO: 40481, 40457) que comprende un dominio de unión a antígeno unido al dominio citosólico de Lck

puede regularse utilizando un inhibidor de Lck. Ejemplos de inhibidores de LCK incluyen Dasatinib y Ponatinib. Los resultados demostraron que el tratamiento con Dasatinib puede utilizarse para regular al alza la actividad de un LINK CAR que comprende el dominio citosólico LCK como dominio de señalización. Estos resultados demuestran que los inhibidores de Lck (*p.ej.*, Dasatinib, Ponatinib, etc.) pueden utilizarse para controlar la actividad de CAR basados en Lck *in vitro* y/o *in vivo*. Los resultados demostraron además que los LINK CAR basados en un mutante de Lck (T316I) (*p.ej.*, SEQ ID NO:40491, 40492) no responden a Dasatinib. Dasatinib puede usarse a una dosis de 40-200 mg/día por vía oral (*p.ej.*, 40, 80, 100, 140, 180, 210 mg/día PO) para controlar la actividad de los CAR basados en Lck. Dasatinib puede administrarse antes, simultáneamente o después de la administración de SAR basados en Lck.

[00626] Los resultados también demuestran la actividad de señalización de los LINK SAR de doble cadena que comprenden el fragmento vL de un anticuerpo unido mediante un enlazador (*p.ej.*, enlazador Ig) a los dominios bisagra y TM de CD3z fusionado a Lck y el fragmento vH de un anticuerpo unido mediante un enlazador (*p.ej.*, enlazador Ig) al dominio bisagra y transmembrana y al dominio citosólico de CD16 (SEQ ID NO:32602). En una realización, los fragmentos vL y vH están intercambiados. En una realización, los dominios bisagra y TM de la segunda cadena también pueden derivarse de CD3z, de modo que el dominio Lck se fusiona con el C-terminal del TM de CD3z (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32601). Alternativamente, los dominios bisagra y TM de CD3z pueden sustituirse por dominios bisagra y TM de otra proteína, como CD16a, FcRy, etc. En una realización, una o ambas cadenas del LINK CAR pueden comprender además un dominio coestimulador (*p.ej.*, el dominio coestimulador CD28 o 4-1BB) que está opcionalmente situado C-terminal al dominio transmembrana.

[00627] Cuando el LINK CAR se expresa en una célula inmunitaria, los fragmentos vL y vH unidos a las dos cadenas de señalización pueden formar un módulo de unión a antígeno que puede unirse específicamente a un antígeno afín y desencadenar la señalización de la célula inmunitaria. El LINK CAR puede comprender además uno o más AABD que se unen N-terminal a los fragmentos vL y/o vH mediante enlazadores opcionales.

[00628] Los resultados también demostraron la actividad de señalización de nuevos LINK SAR de doble cadena que comprenden el fragmento vL de un anticuerpo unido mediante un enlazador (*p.ej.*, enlazador Ig) a la bisagra y a los dominios TM y CP de CD3z y el fragmento vH de un anticuerpo unido mediante un enlazador (*p.ej.*, enlazador Ig) a una bisagra y a un dominio transmembrana que está fusionado a LAT o a un mutante del mismo (LAT-200-262del) (SEQ ID NO: 32605). En una realización, los fragmentos vL y vH están intercambiados. En una

realización, los dominios bisagra y TM de la segunda cadena también pueden derivarse de CD3z, de modo que LAT o un mutante del mismo (LAT-200-262del) se fusiona con el C-terminal del TM de CD3z. Alternativamente, los dominios bisagra y TM de CD3z pueden sustituirse por dominios bisagra y TM de otra proteína, como CD16a, FcRy, etc. En una realización, una o ambas cadenas del CAR basado en LAT pueden comprender además un dominio coestimulador (*p.ej.*, el dominio coestimulador CD28 o 4-1BB) que está opcionalmente situado C-terminal al dominio transmembrana. Cuando el SAR basado en LAT se expresa en una célula inmunitaria, los fragmentos vL y vH unidos a las dos cadenas de señalización pueden formar un módulo de unión a antígeno que puede unirse específicamente a un antígeno afín y desencadenar la señalización de la célula inmunitaria. El LAT-LINK-SAR puede comprender además uno o más AABD que se unen N-terminal a los fragmentos vL y/o vH mediante enlazadores opcionales. En una realización, el dominio citosólico CD3z comprende la mutación dQ101. En una realización, el dominio LAT se sustituye por el dominio SLP-70 o un mutante del mismo (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32604).

[00629] Los resultados demuestran además que los módulos accesorios que comprenden coreceptores tales como CD8a, CD8b, CD4 o la combinación de los mismos pueden expresarse con cualquiera de los SAR de la divulgación (*p.ej.*, uTCR-SAR, zSAR, zCD16-SAR, HC-SAR, SIR, etc.) (véase SEQ ID NO: 1045-1059). Los resultados demuestran además que los módulos accesorios que comprenden ligandos coestimuladores (*p.ej.*, 4-1BBL, CD48, CD80, CD86, etc.) o la combinación de los mismos pueden expresarse con cualquiera de los SAR de la divulgación (*p.ej.*, uTCR-SAR, zSAR, zCD16-SAR, HC-SAR, SIR, etc.) para aumentar su actividad (SEQ ID NO: 32320).

[00630] Los resultados también demostraron nuevos zSAR de doble cadena que comprenden el fragmento vL de un anticuerpo unido mediante un enlazador (*p.ej.*, enlazador Ig) a la bisagra y dominios TM y CP de CD3z y el fragmento vH de un anticuerpo unido mediante un enlazador (*p.ej.*, enlazador Ig) a una bisagra y dominio transmembrana de una cadena de señalización diferente (SEQ ID NO: 32481-32484). En una realización, se intercambian los fragmentos vL y vH. En una realización, la segunda cadena de señalización puede comprender el dominio bisagra, TM y CP de CD3 γ , CD3 δ o CD3 ϵ . En una realización, una o ambas cadenas del SAR pueden comprender además un dominio coestimulador (*p.ej.*, el dominio coestimulador CD28 o 4-1BB) que está opcionalmente situado C-terminal a los dominios transmembrana. Cuando el SAR se expresa en una célula inmunitaria, los fragmentos vL y vH unidos a las dos cadenas de señalización pueden formar un módulo de unión a antígeno que puede unirse específicamente a un antígeno afín y desencadenar la señalización de la célula inmunitaria. El SAR puede comprender además uno o más AABD que se unen N-terminal a los fragmentos vL

y/o vH mediante enlazadores opcionales. En una realización, el dominio citosólico CD3z comprende la mutación dQ101.

[00631] Construcciones SAR con cadenas TCR híbridas

[00632] Las construcciones SAR de la tabla anterior se expresan en células T primarias mediante transferencia génica mediada por lentivirus y se comprueba su citotoxicidad contra las líneas celulares diana que expresan Gluc o LucPPE mediante ensayos Matador o Matador-Glo, respectivamente. Las construcciones SAR inducen la lisis específica de las células diana. Las construcciones SAR también inducen la producción de TNF α e IFN γ en cocultivo con sus líneas celulares diana. Por último, se comprueba la actividad *in vivo* de las construcciones SAR utilizando modelos de xenoinjerto en ratones NSG, tal como se describe en el documento PCT/US2019/035096, y se demuestra su eficacia.

[00633] Cadena híbrida SIR

[00634] Se construyen varios constructos SIR de cadena híbrida dirigidos a CD19 que comprenden fragmentos vL y vH derivados de un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado (hu-mROO5) y están representados por SEQ ID NO: 1063-1066. Las construcciones se expresan en células JNG y se demuestra que inducen la expresión de GFP en cocultivo con células CD19+ RAJI. Las construcciones también se expresan en células T primarias y se demuestra que inducen la lisis específica de líneas celulares diana CD19+ (*p.ej.*, RAJI, NALM6) mediante el ensayo Matador. Se construyen varias construcciones SIR adicionales de cadena y media y cadena híbrida de doble cadena seleccionadas de SEQ ID NO: 3931-8074, 8076-8103, 8106-8393, 23237-23264 y dirigidas a diferentes antígenos y que comprenden diferentes dominios de unión a antígeno. De forma similar, se construyen SAR que comprenden cadenas TCR con dominios de activación CD3z C-terminal y dominios coestimuladores 41BB/CD28 seleccionados de SEQ ID NO: 27922-27. Estas construcciones se expresan en células JNG y se demuestra que inducen GFP tras la exposición a sus líneas celulares diana. También se expresan en células T primarias y se demuestra que inducen citotoxicidad y producción de citocinas cuando se exponen a sus líneas celulares diana.

[00635] Análisis comparativo del SAR de cadena híbrida en células JNG

[00636] Las células T JNG que expresan diferentes construcciones SAR CD19 uniespecíficos y biespecíficos (HC-SAR, zSIR, zCD16-SAR, etc.) se cocultivan con células diana Raji que expresan un alto nivel de CD19. Las células se sembraron en una placa de 24 pocillos a una proporción Efectora: Diana (E:T) de 1:1 durante toda la noche. Al día siguiente, se recogieron estas células y se analizó la inducción de GFP mediante citometría de flujo. Se recogieron los sobrenadantes celulares de estas células cocultivadas para medir la secreción de hIL2 utilizando el dúo kit hIL2 ELISA (R&D Systems). Los resultados se muestran en la siguiente **Tabla 14**. La

construcción con SEQ ID NO: 32450 es una construcción SIR convencional que comprende fragmentos vL y vH de hu-mROO5-1 unidos a cadenas TCR α y TCR β humanas que portan mutaciones T48C y S57C. Las otras construcciones son construcciones SIR de cadena híbrida, zSIR o zCD16-SAR. la **Tabla 14** muestra que las células JNG que expresan el HC-SAR tienen un nivel variable de inducción de GFP inducida por NFAT y secreción de IL2 con algunas construcciones (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32584, 32587 que muestran una mayor inducción de GFP en comparación con SIR con SEQ ID NO: 32450). Ambas construcciones tienen los mismos fragmentos vL y vH derivados de hu-mROO5-1 como dominios de unión. En la construcción con SEQ ID NO: 3584 la cadena TCR β humana de las construcciones con SEQ ID NO: 32450 se sustituye por una cadena híbrida TCR $\beta\gamma$ que comprende el dominio constante y connP del TCR β humano y los dominios TM y CP del TCR γ humano. La capacidad de esta construcción para inducir GFP e IL2 fue sorprendente, ya que sólo tiene una cadena híbrida. En la construcción con SEQ ID NO: 3587, la cadena del TCR β humano se sustituye por una cadena híbrida del TCR $\gamma\beta$ que comprende el dominio constante y connP del TCR humano y los dominios TM y CP del TCR β humano. Además, la cadena TCR α humana se sustituye por una cadena híbrida TCR $\delta\alpha$ que comprende el dominio constante y connP del TCR δ humano y los dominios TM y CP del TCR α humano. La construcción con SEQ ID NO: 32589 también fue muy eficaz. Esta construcción es similar en diseño a la construcción con SEQ ID NO: 32587 pero tiene una unión diferente en la cadena híbrida del TCR $\delta\alpha$. Varias construcciones HC-SAR adicionales mostraron una inducción significativa de GFP e IL2. Otro resultado sorprendente fue que las construcciones con diferentes cadenas híbridas mostraron diferentes niveles de inducción de IL2, aunque mostraron niveles similares de inducción de GFP impulsada por NFAT (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32589 vs 32582, 32816, 32817, 32840 y 32851, etc.). Así, el uso de cadenas híbridas permite generar construcciones SIR con activación diferencial de distintas funciones efectoras. Las células JNG que expresan diferentes constructos zSIR también mostraron una amplia gama de capacidades de inducción de GFP e IL2. En conjunto, estos sorprendentes resultados proporcionan un método rápido y sencillo para generar un panel de constructos con diferentes fuerzas de señalización y diferentes capacidades para inducir la producción de citoquinas.

[00637] En un experimento independiente, las células JNG que expresaban las construcciones HC-SAR con SEQ ID NO: 40484, 40485 y 40486 mostraron una inducción muy fuerte de GFP inducida por NFAT cuando se expusieron a células RAJI. Todas estas construcciones comprenden dominios constantes basados en anticuerpos (*p.ej.*, IgCL e IgG1-CH1). La construcción con SEQ ID NO: 40484 comprende una cadena TCR híbrida que

comprende un dominio constante IgCL unido a una cadena TCR $\gamma\beta$ humano híbrida. Esta cadena TCR $\gamma\beta$ comprende el ConnP del TCR γ humano fusionado al TM y CP del TCR β humano β . La segunda cadena de este HC-SAR comprende un dominio IgG1-CH1 unido a una cadena TCR $\delta\alpha$ humano híbrida. Esta cadena comprende el ConnP del TCR δ humano fusionado al TM y CP del TCR α humano. La construcción con SEQ ID NO:40485 es similar a SEQ ID NO: 40484 pero tiene una unión diferente en la cadena híbrida de TCR $\delta\alpha$ humano. La construcción con SEQ ID NO: 40486 se parece a las construcciones con SEQ ID NO: 40484 y 40485 en una cadena. Sin embargo, en esta construcción, el TCR $\delta\alpha$ híbrido de las construcciones con SEQ ID NO: 40484 y 40485 se sustituye por un fragmento que comprende el ConnP, TM y CP del TCR α humano.

TABLA 14

	HC-SAR			zSIR	
SEQ ID	%GFP	IL2 (pg/ml)	SEQ ID	%GFP	IL2 (pg/ml)
32450	36.28%	28900	32841	9.60%	5461
32572	19.25%	7867	32547	29.00%	22167
32573	20.38%	21067	32877	33.30%	34333
32574	5.91%		32844	2.70%	
32463	25.71%		32843	3.90%	11250
1062	21.04%	3944	32605	28.60%	50383
1063	6.62%		32606	19.40%	18517
1064	18.96%	1450	32607	18.50%	12717
1065	5.70%		32608	0.50%	
1066	17.10%	3011	32541	15.20%	
32584	38.10%	43583	32542	21.90%	100
32585	14.70%	16500	32543	19.60%	2489
32587	41.60%	45533	32544	15.90%	2022
32588	17.70%	27200	32545	28.06%	
32589	22.20%	34900	32546	17.50%	3033
32591	14.32%	18467	32547	16.60%	72
32549	27.30%	1878	32548	29.70%	8539
32582	24.60%	2706			
32815	20.90%				
32816	21.90%	1000			
32817	31.60%	2644			
32840	29.70%	9172			
32851	23.60%	4450			
32853	23.80%	2589			
32818	17.10%	4606			
32819	4.90%				
32820	3.60%				
32821	7.70%				

[00638] En un experimento independiente, las células JNG que expresaban las construcciones HC-SAR con SEQ ID NO: 40484, 40485 y 40486 mostraron una inducción muy fuerte de GFP inducida por NFAT cuando se expusieron a células RAJI, con un 59%, 55% y 39% de células, respectivamente, que mostraron inducción de GFP tras el cocultivo durante la noche. Todas estas construcciones comprenden dominios constantes basados en anticuerpos (*p.ej.*, IgCL e IgG1-CH1). La construcción con SEQ ID NO: 40484 comprende una cadena TCR híbrida que comprende un dominio constante IgCL unido a una cadena TCR $\gamma\beta$ humana híbrida. Esta cadena TCR $\gamma\beta$ comprende el ConnP del TCR γ humano fusionado al TM y CP del TCR β humano. La segunda cadena de este HC-SAR comprende un dominio IgG1-CH1 unido a una cadena TCR $\delta\alpha$ humana híbrida. Esta cadena comprende el ConnP del TCR δ humano fusionado al TM y CP del TCR α humano. La construcción con SEQ ID NO: 40485 es similar a SEQ ID NO: 40484 pero tiene una unión diferente en la cadena híbrida de TCR $\delta\alpha$ humano. La construcción con SEQ ID NO: 40486 se parece a las construcciones con SEQ ID NO: 40484 y 40485 en una cadena. Sin embargo, en esta construcción, el TCR $\delta\alpha$ híbrido de las construcciones con SEQ ID NO: 40484 y 40485 se sustituye por un fragmento que comprende el ConnP, TM y CP del TCR α humano. Estos resultados demuestran que es posible generar HC-SAR que comprenden los dominios constantes de anticuerpos y cadenas híbridas que comprenden ConnP, TM y CP derivados de diferentes cadenas de TCR. Estos resultados demuestran que es posible generar construcciones SIR funcionales en las que una de las dos cadenas es una cadena híbrida que comprende la fusión de al menos tres polipéptidos (*p.ej.*, el dominio constante del anticuerpo, ConnP de una cadena TCR y TM y/o CP de una cadena TCR diferente). La segunda cadena TCR en tal SIR puede ser una fusión de dos proteínas (*p.ej.*, dominio constante de anticuerpo fusionado a ConnP, TM y CP de una cadena TCR) o una fusión de tres proteínas (*p.ej.*, dominios constantes de anticuerpos y cadenas híbridas que comprenden ConnP, TM y CP derivados de cadenas TCR diferentes).

[00639] Se construyen varias HC-SAR uniespecíficas y biespecíficas adicionales que comprenden diferentes dominios de unión a antígenos. Estas construcciones comprenden una o dos cadenas híbridas en las que cada cadena es una fusión entre dos o tres proteínas. Estas construcciones se ensayan como se ha indicado anteriormente y se demuestra que son activas en la inducción de GFP inducida por NFAT. Las construcciones representativas se muestran mediante SEQ ID NO: 40140-40434.

Análisis comparativo de SAR de cadena híbrida en células T primarias

[00640] Las células T se aislaron utilizando microperlas CD3 (Miltenyi) y se infectaron con un panel de construcciones SAR (*p.ej.*, CAR, SIR y HC-SAR) dirigidas a CD19. Todas las

construcciones SAR incluían los fragmentos hu-mROO5-1 vL, vH o scFv como dominio de unión al antígeno. Las células T se sembraron en placas de 6 pocillos en medio XVIVO15 suplementado con 50 UI/ml de IL2 y 5% de suero hAB durante 4 días para su expansión. Para el ensayo Matador, las células RAJI que expresaban Luc-PPE se sembraron a 5.000/pocillo/30 µl por triplicado en una placa de 384 pocillos en medio XVIVO15 sin ningún suplemento. Se añadieron células T de control y células T que expresaban SAR a Efector: Diana (E:T=1:1) en 30 µl/pocillo por triplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación, se añadieron 15 µL de tampón de ensayo de luciferasa D-Luciferin a cada pocillo y se leyó la luminiscencia durante 10 segundos. Para el ensayo ELISA, las células RAJI que expresaban Luc-PPE se sembraron a 50,000 pocillos/100 µl por triplicado en una placa de 96 pocillos con fondo en U en medio XVIVO15 sin ningún suplemento. Se añadieron células T en proporción E:T=1:1 en 100 µl/pocillo por triplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Tras la incubación, se recogieron muestras y se midió la secreción de hIFN γ , hTNF α y hIL2 en los sobrenadantes celulares mediante dúo kits ELISA (R&D Systems). Los resultados se muestran en la siguiente **Tabla 15**. Los resultados demuestran que varias construcciones HC-SAR (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32587-32589 y 32591) muestran una expresión, citotoxicidad y producción de citocinas superiores en comparación con las construcciones SIR (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32450 y 32488). Varios constructos HC-SAR (*p.ej.*, 32463 y 32591) mostraron una citotoxicidad equivalente a las construcciones CAR (SEQ ID NO: 32315) y SIR (SEQ ID NO: 32450 y 32488) pero con una producción de citocinas (*p.ej.*, IFN γ , TNF α) mucho menor. También se observó una diferencia entre las distintas construcciones en su capacidad para inducir la producción de IL2. En conjunto, estos resultados demostraron que el enfoque HC-SAR proporciona un enfoque rápido, económico y eficiente para generar un gran panel de construcciones SIR de diferentes intensidades de señalización, citotoxicidad, producción de citocinas y expresión basados en un único módulo de unión a antígeno (*p.ej.*, fragmentos vL/vH). Por lo tanto, dependiendo de la indicación diana, se puede seleccionar rápidamente un SIR de afinidad, citotoxicidad, producción de citocinas y potencia deseadas a partir de un panel de HC-SAR que comprenda el mismo dominio de unión a antígeno pero diferentes tipos y combinaciones de cadenas híbridas y no híbridas. Así, el enfoque HC-SAR evita la necesidad de generar y probar un gran panel de anticuerpos para seleccionar un anticuerpo adecuado para la generación de un SIR de afinidad y potencia deseadas.

[00641] TABLA 15

Arquitectura SAR	SEQ ID NO:	Luc Relativa (Ensayo de Citotoxicidad Matador)	Tinción de Proteína a L (%)	IFN γ -conc (pg/ml)	TNF α -conc (pg/ml)	IL2-conc (pg/ml)

	Medios de comunicaci ^o n	4713		ND	ND	ND
	T-UI	6519	10.00%	ND	ND	ND
CAR	32315	10206	81.43%	22688	11881	38150
SIR	32450	10513	15.15%	23129	9074	19117
SIR	32448	10757	17.42%	24238	10801	27750
HC-SAR	32573	7915	18.60%	3854	327	1483
HC-SAR	32463	10092	40.12%	9813	1234	2417
HC-SAR	1066	9041	12.37%	9579	1081	3250
HC-SAR	40430	7598	20.68%	1429	ND	317
HC-SAR	32563	9086	23.39%	10913	1507	2150
HC-SAR	32597	7122	22.44%	ND	ND	ND
HC-SAR	32598	8165	16.76%	8629	601	550
HC-SAR	40431	9212	12.92%	12338	3434	15617
HC-SAR	32587	11379	64.14%	19054	5847	20417
HC-SAR	32588	11960	79.22%	23979	8014	23717
HC-SAR	32589	10555	75.74%	21571	7014	24817
HC-SAR	32591	10323	60.07%	13429	4621	12650
HC-SAR	32581	11074	47.41%	23888	11401	40683
HC-SAR	32582	10339	28.88%	19563	9434	36383
HC-SAR	32551	9816	27.11%	13646	4261	10183
HC-SAR	32552	8097	20.18%	5288	ND	517

El análisis anterior también arrojó varios resultados sorprendentes e imprevistos. En primer lugar, varias construcciones SAR con una cadena híbrida y otra nativa mostraron una fuerte actividad de señalización. En segundo lugar, varios tipos de cadenas híbridas con diferentes lugares de unión entre las dos cadenas mostraron una fuerte actividad de señalización, lo que indica que no existe un único lugar de unión entre las dos cadenas. De hecho, las cadenas híbridas que comprenden las mismas dos cadenas, pero diferentes sitios de unión mostraron una actividad de señalización ligeramente diferente, lo que sugiere que es posible generar una diversidad adicional en los SAR simplemente utilizando los diferentes sitios de unión. En tercer lugar, varias cadenas híbridas mostraron actividad señalizadora cuando se emparejaron con dos cadenas de tipo salvaje diferentes. Así, una cadena híbrida que comprendía el dominio constante del TCR β y el ConnP, TM y CP del TCR γ mostró señalización cuando se emparejó con cadenas del TCR α o del TCR δ . Por último, varias construcciones SAR de cadenas híbridas mostraron una expresión y actividad superiores a las construcciones que comprendían cadenas TCR de tipo salvaje.

SAR y uTCR-SAR con cadena CD3z con mutación dQ101

[00642] Las construcciones SAR (*p.ej.*, zSIR) y uTCR-SAR que comprenden una o dos cadenas CD3z con mutación dQ101 y dirigidas a PSMA (SEQ ID NO: 1108-1110) se

construyen y expresan en células JNG. Las construcciones con la(s) mutación(es) dQ101 inducen una mayor expresión de GFP cuando se exponen a células diana LNCaP en comparación con construcciones similares que carecen de la mutación dQ101 en una o ambas cadenas CD3z (*p.ej.*, SEQ ID NO: 1088-1089, 1017-1020). De forma similar, los SAR uniespecíficos y biespecíficos (*p. ej.*, construcciones zSIR) dirigidos a CD19 y/o CD20 que comprenden mutaciones dQ101 (*p. ej.*, SEQ ID NO:1105-1107) se expresan en células JNG y se observa que inducen una fuerte inducción de GFP tras la exposición a células diana RAJI y RAJI-CD19-KO. Los resultados muestran además que las construcciones que comprenden una cadena CD3z y una cadena CD16 muestran una fuerte inducción de GFP, que, en general, es más fuerte que las construcciones que comprenden dos cadenas CD3z o una cadena CD3z y una cadena FcRy. Del mismo modo, las construcciones de doble cadena basadas en z-CD16 con mutación dQ101 en la cadena CD3z muestran una actividad eficaz *in vitro* e *in vivo*.

[00643] CD16-SAR con cadenas CD16 mutantes

[00644] Se construyen varias SAR basadas en CD16 que comprenden hu-mROO5-1 scFv unido al dominio extracelular y transmembrana de CD16 pero que carecen del dominio citosólico de CD16. Estas construcciones están representadas por SEQ ID NO: 22717-18, 1214, 1495, 1776, 2057. Las construcciones se expresan en células JNG y se demuestra que inducen GFP en cocultivo con células RAJI. Varias construcciones SAR de doble cadena (SEQ ID NO:2231-2234) que comprenden la cadena CD3z y una cadena CD16 mutante que comprende el dominio bisagra y transmembrana de CD16 pero carece del dominio citosólico de CD16. Las construcciones se expresan en células JNG, células T y NK primarias y demuestran su actividad en ensayos JNG-NFAT-GFP y Matador.

[00645] Construcciones SAR sintonizables

[00646] Se construye y expresa en células JNG una construcción SAR dirigido a CD19 (SEQ ID NO: 1040) que comprende fragmentos hu-mROO5-1 vL y vH unidos a cadenas CD3z a través de enlazadores similar a Ig de cadenas TCRa y TCRb y que también comprende un dominio FKBP12-F36V unido a una de las cadenas CD3z. Las células JNG que expresan la construcción se tratan con dTAG (100nM) o se dejan sin tratar y luego se cocultivan con células RAJI. Se demuestra que el tratamiento con dTAG reduce la inducción de GFP tras el cocultivo con células RAJI.

[00647] Se construye una construcción SAR dirigido a CD19 (SEQ ID NO: 1041) que comprende un dominio IKZF1-ZF2-ZF3-141-243 unido a una de las cadenas CD3z y se expresa en células JNG. Las células JNG que expresan la construcción se tratan con lenalidomida (LEN) o pomalidomida (POM) o se dejan sin tratar y luego se cocultivan con células RAJI. Se demuestra que el tratamiento con lenalidomida y pomalidomida disminuye la inducción de GFP

tras el cocultivo con células RAJI. Se obtienen resultados similares con otra construcción CD19 SAR (SEQ ID NO: 1096) basada en los dominios vL y vH de hu-mROO5-1 y que lleva un módulo IKZF3-136-180-236-249-K0 unido a una cadena CD3z y un segundo módulo IKZF3-136-180-236-249-K0 unido a una segunda cadena FcRy.

[00648] Las células T que expresan SAR CD79b inducen citotoxicidad en las células que expresan CD79b. Se construye un amplio panel de SAR con diferentes arquitecturas (*p.ej.*, SIR, zSIR, zCD16-SAR, CAR, cadena híbrida SIR, etc.) y que comprenden los fragmentos vL, vH y scFv representados por los SEQ ID NO: 32028-32042, 32091-32105 y 32154-32168 y se demuestra que poseen un nivel variable de actividad cuando se expresan en células JNG y se exponen a la línea celular JEKO-1 que expresa CD79b. Las células T de sangre periférica humana aisladas mediante perlas magnéticas CD3 se infectaron con lentivirus que expresaban las construcciones SAR (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32770-32278) dirigidas a CD79b. Las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32770, 32774 y 32277 tienen la arquitectura de un SIR y difieren en sus fragmentos vL y vH. Estas construcciones comprenden el fragmento vL de un anticuerpo CD79b unido a una cadena constante TCR β humana optimizada para codón que comprende la mutación S57C (SEQ ID NO: 470). El fragmento vH complementario está unido a una cadena constante TCR α humana optimizada para codón que comprende la mutación T48C (SEQ ID NO: 458). Las construcciones con SEQ ID NO: 32771 y 32773 son construcciones SAR de cadena híbrida en las que el fragmento vL de un anticuerpo CD79b humanizado está unido a una cadena TCR híbrida (SEQ ID NO: 23229) que comprende el dominio enlazador similar a Ig y el péptido conector de la cadena TCR β humana fusionada en marco al dominio transmembrana y citosólico de la cadena TCR γ humana. El fragmento vH del anticuerpo está unido operativamente a la cadena constante del TCR α humano que comprende la mutación T48C (SEQ ID NO: 458). En las construcciones SAR 32271, 32273 y 32278, el fragmento vL está unido a un fragmento (SEQ ID NO: 946) que codifica un enlazador similar a Ig derivado del TCR β fusionado al dominio bisagra, transmembrana y citosólico de CD3z (variante dQ101). El fragmento vH complementario está unido a un fragmento (SEQ ID NO: 31997) que codifica un enlazador similar a Ig derivado del TCR α fusionado al dominio bisagra, transmembrana y citosólico de CD16a. La construcción SAR con SEQ ID NO: 32276 es una construcción CAR de segunda generación que comprende un scFv CD79b humanizado unido mediante dominios bisagra y transmembrana de CD8 humano a un dominio coestimulador 41BB y un dominio de activación CD3z. La expresión de SAR en la superficie de las células T se examinó mediante tinción con proteína L seguida de citometría de flujo. Las células T que expresan las diferentes construcciones SAR muestran una tinción variable con proteína L. Las células T que expresan

las construcciones 120323-EZwA1 (SEQ ID NO: 32270), 120323-EZwF1 (SEQ ID NO: 32271), 113023-EZtP1 (SEQ ID NO: 32272), 120323-EZwO1 (SEQ ID NO: 32273), 112523-EZsD1 (SEQ ID NO: 32274), 112923-EZuM1 (SEQ ID NO: 32276), 100123-EZxD1 (SEQ ID NO: 32277), y 112923-EZtG1 (SEQ ID NO: 32278) muestran un 22%, 87%, 22%, 63%, 15%, 65%, 11% y 13% de células que se unen a la proteína L, respectivamente. Para confirmar los resultados y obtener una medida de la afinidad, las células T (0.5×10^6) que expresan las diferentes construcciones SAR se tiñeron con 1 $\mu\text{g/mL}$ de CD79-Fc humano Acro Biosystems (Nº de cat. CDB-H5259) durante 1 hora a 4°C seguido de un lavado con tampón FACS frío (PBS + 2% BSA). Las células se tiñen en tinción con Goat-Anti-Human-IgG-PE (Southern Biotech, Cat. No. 2040-09), se incuban durante 1 hora a 4°C y se analizan por citometría de flujo. Las diferentes construcciones SAR muestran de nuevo una tinción variable con CD79b-Fc. Las células T que expresan las construcciones SAR 120323-EZwA1 (SEQ ID NO: 32270), 120323-EZwF1 (SEQ ID NO: 32271), 113023-EZtP1 (SEQ ID NO: 32272), 120323-EZwO1 (SEQ ID NO: 32273), 112523-EZsD1 (SEQ ID NO: 32274), 112923-EZuM1 (SEQ ID NO: 32276), 100123-EZxD1 (SEQ ID NO: 32277), y 112923-EZtG1 (SEQ ID NO: 32278) muestran un 43%, 70%, 36%, 36%, 21%, 53%, 3% y 1% de tinción CD79-Fc, respectivamente. La citotoxicidad de las células T que expresan las diferentes construcciones SAR se examina mediante el ensayo Matador-Glo utilizando células JEKO-1 y RAJI que expresan LucPpE-146-1H2 en diferentes proporciones E:T y tiempos de cocultivo de 4-48 horas. Las células T que expresan todas las construcciones muestran una citotoxicidad significativa. El porcentaje de lisis específica de las células T que expresan las construcciones 120323-EZwA1 (SEQ ID NO: 32270), 120323-EZwF1 (SEQ ID NO: 32271), 113023-EZtP1 (SEQ ID NO: 32272), 120323-EZwO1 (SEQ ID NO: 32273), 112523-EZsD1 (SEQ ID NO: 32274), 112923-EZuM1 (SEQ ID NO: 32276) tras 24 h de cocultivo con células JEKO-1 en una proporción E:T de 5:1 fue del 44%, 46%, 43%, 35%, 42% y 36% respectivamente. Las células SAR-T se expandieron en cultivo durante más de 10 días y la producción de citoquinas por diferentes células SAR-T se midió mediante ELISA en el sobrenadante tras 48 h de cocultivo con células Daudi. La mayor producción de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ se observó con células SAR-T que expresaban la construcción CAR de 2ª generación 112923-EZuM1 (SEQ ID NO: 32276). La construcción SAR de cadena híbrida 113023-EZtP1 (SEQ ID NO: 32272) en la arquitectura SIR de doble cadena mostró la siguiente mayor secreción de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ seguida de las construcciones SIR 120323-EZwA1 (SEQ ID NO: 32270) y 112523-EZsD1 (SEQ ID NO: 32274), respectivamente. Las construcciones SAR 120323-EZwF1 mostraron una producción modesta de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ mientras que la construcción SAR 120323-EZwO1 mostró una producción baja de estas citoquinas. Por el contrario, las células T que expresaban la construcción 112923-EZuM1 no

produjeron IL2 en cocultivo con células Daudi. Las células T que expresan las construcciones SAR 120323-EZwA1 y 113023-EZtP1 mostraron la mayor secreción de IL2. Las células T que expresan las construcciones SAR y 120323-EZwF1, 120323-EZwO1, 112523-EZsD1 mostraron una secreción moderada de IL2.

[00649] La actividad *in vivo* de las distintas células SAR-T se comprobó utilizando un modelo de xenoinjerto JEKO-1 en ratones NSG. Se inyectaron células Jeko1-Luc-PPE a través de la vena caudal (0.5 millones de células/ratón) en ratones (n=5 o 4). Se inyectaron células T (5 millones de células/ratón) que expresaban los diferentes constructos SAR mediante inyección en la vena de la cola 7 días después. Los animales fueron examinados mediante imágenes de bioluminiscencia. Todos los animales que recibieron células SAR-T mostraron un control tumoral eficaz en comparación con los animales que recibieron células T de control. El mejor control tumoral se observó en los animales que recibieron células T que expresaban las construcciones EZwA1, 120323-EZwF1, 113023-EZtP1, respectivamente.

[00650] En un experimento independiente, las construcciones SAR dirigidos a CD79b con SEQ ID NO: 32277, 32279-32283 se expresaron en células T utilizando el protocolo descrito anteriormente. La construcción con SEQ ID NO: 32279 es una construcción CAR uniespecífico de segunda generación dirigido a CD79b. Las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32280-81 son construcciones SIR de doble cadena uniespecíficas que se dirigen a CD79b. Difieren en sus dominios de unión a antígeno, pero son similares en diseño a la construcción SIR con SEQ ID NO: 32277 descrito anteriormente. Las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32282 y 32283 son construcciones SIR biespecíficos que además de dirigirse a CD79b también se dirigen a CD20 y BCMA, respectivamente. La citotoxicidad de las células T que expresan las diferentes construcciones SAR contra células JEKO-1 (CD79b +) y RAJI (CD79b+, CD20+, BCMA+) se demostró mediante el ensayo de citotoxicidad Matador-Glo. Todas las construcciones demostraron una citotoxicidad eficaz contra las células JEKO-1 y RAJI. Las construcciones SAR biespecíficos mostraron una mayor citotoxicidad contra las células RAJI. La construcción SIR biespecífico con SEQ ID NO: 32283 también mostró una mayor producción de citoquinas (TNF α , IFN γ , e IL2) cuando se cocultivó con células RAJI. La construcción SIR uniespecífica (SEQ ID NO: 32277) mostró una citotoxicidad eficaz y una producción de TNF α e IFN γ en comparación con otros constructos uniespecíficos cuando se cocultivaron con células JEKO-1 o RAJI. La actividad *in vivo* de las diferentes células SAR-T se confirma utilizando el modelo de xenoinjerto JEKO-1 en ratones inmunodeficientes (NSG) (n = 5). Los ratones a los que se administraron todas las construcciones SAR-T mostraron un control tumoral eficaz en comparación con los ratones a los que no se administraron células T o con los ratones a los que

se administraron células T de control. Las células SAR-T que expresan la construcción SIR con SEQ ID NO: 32277 mostraron el mejor control tumoral.

[00651] A continuación, se construyó una construcción CD79b SAR con SEQ ID NO: 32426 en la que el fragmento vL de la construcción SEQ ID NO: 32270 se sustituye por un fragmento vL representado por SEQ ID NO: 32034. El fragmento vH de esta construcción está representado por la SEQ ID NO: 32092. Esta construcción SAR tiene la arquitectura de un SIR de doble cadena y comprende el fragmento vL unido en marco a la cadena del TCR β humano (SEQ ID NO: 470) y el fragmento vH unido en marco a la cadena del TCR α humano (SEQ ID NO: 458). Esta construcción SAR se expresó en células JNG mediante transferencia génica mediada por lentivirus. Se demostró que las células JNG que expresaban esta construcción SAR inducían fuertemente la expresión de GFP impulsada por NFAT cuando se cocultivaban con células JEKO-1. Una construcción representada por SEQ ID NO: 32427 en la que el fragmento vH de la construcción con SEQ ID NO: 32426 se sustituye por un fragmento vH representado por SEQ ID NO: 32091 también se, muestra altamente, activa cuando se expresa en células JNG. Las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32426 y 32427 se expresan en células T primarias y se comprueba su actividad *in vitro* e *in vivo* mediante los ensayos descritos anteriormente.

[00652] En los SEQ ID NO: 37785-38569, 40187-40200, 40230-40243, 40275-40286, 50054-50084, 50177-50558, 50598-50609, 50631-50642, *etc.*) se presentan construcciones SAR representativas uniespecíficas, biespecíficas y multiespecíficas dirigidas a CD79b en diferentes arquitecturas y que comprenden diferentes dominios de unión a antígeno (*p.ej.*, vL, vH y fragmentos scFv). Las construcciones SAR con SEQ ID NO: 50054-50058 se transfectan en células 293T. Estas construcciones pertenecen a la arquitectura zCD16 y comprenden una cadena CD3z con mutación dQ101 y una segunda cadena que comprende los dominios bisagra, transmembrana y citosólico de CD16. Al día siguiente, la tinción con proteína L y CD79b-Fc muestra la expresión del SAR en aproximadamente el 29-50% de las células transfectadas. En particular, las células 293FT transfectadas con construcciones SAR con SEQ ID NO: 50055 y 50056 muestran un 41% y 51% de tinción con proteína L, respectivamente y un 41% y 41% de tinción con reactivo CD79b-Fc, respectivamente. Las construcciones representativas también se expresan en células T y su citotoxicidad, producción de citocinas y actividad *in vivo* se demuestran mediante los ensayos descritos anteriormente. Estas construcciones pueden utilizarse para generar una respuesta inmunitaria polifuncional y diversa. Las construcciones CD79b SAR también se expresan en células T derivadas del cordón umbilical y demuestran una fuerte expresión y actividad letal *in vitro* e *in vivo*. Los linfocitos T de cordón umbilical que expresan

la construcción CD79b SAR se utilizan como un enfoque disponible para el tratamiento de leucemias de células B, linfomas y trastornos autoinmunes (*p.ej.*, lupus).

[00653] Para detectar la expresión y expansión de la construcción SAR de CD79b, se construye un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de CD79b (SEQ ID NO: 32005) en fusión con una luciferasa marina. El fragmento de ADN también lleva un péptido señal CD8 de 5' (SEQ ID NO: 32004). El fragmento de ADN resultante se clona en marco con un casete polinucleotídico codificador de NLuc 3'. El casete también lleva etiquetas de epítipo en tándem para permitir la purificación de la proteína y su detección por FACS. La construcción de fusión resultante está representada por SEQ ID NO: 40530. La fracción Nluc de esta construcción puede sustituirse por cualquier otra luciferasa marina, como Gluc, Turbo-Luc, etc. La proteína de fusión se expresa en células 293FT y se utiliza para detectar células que expresan construcciones SAR dirigidos a CD79b.

[00654] Las células T que expresan SAR STEAP2 inducen citotoxicidad en las células que expresan STEAP2. Las células T de sangre periférica humana aisladas mediante perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32292-32295. Estas construcciones SAR comprenden vL, vH y scFv representados por SEQ ID NO: 19776, 19795 y 19814, respectivamente. El SAR con SEQ ID NO: 32294 es una construcción CAR de 2ª generación que comprende un scFv STEAP2 (SEQ ID NO: 19814) unido operativamente a una bisagra CD8 y dominios transmembrana, un dominio citosólico 41-BB y un dominio citosólico CD3z. Las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32293-94 tienen la arquitectura de las construcciones SIR de doble cadena. En la construcción con SEQ ID NO: 32293, el fragmento vH (SEQ ID NO: 19795) está unido operativamente en el marco a una cadena TCRβ humana optimizada en codones con mutación S57C (SEQ ID NO: 470) y el fragmento vL (SEQ ID NO: 19776) está unido operativamente a una cadena TCRα humana optimizada en codones con mutación T48C (SEQ ID NO: 458). En la construcción con SEQ ID NO: 32294, el fragmento vH está unido a una cadena TCRα humana optimizada en codones y murinizada con mutación T48C (SEQ ID NO: 455) y el fragmento vL (SEQ ID NO: 19776) está unido operativamente en marco a una cadena TCRβ humana optimizada en codones y murinizada con mutación S57C (SEQ ID NO: 471). La construcción SAR con SEQ ID NO: 32295 tiene la arquitectura de un SAR CD3z-CD16. En esta construcción, el fragmento vH (SEQ ID NO: 19795) está unido a un fragmento (SEQ ID NO: 946) que codifica un enlazador similar a Ig derivado del TCRβ fusionado al dominio bisagra, transmembrana y citosólico de CD3z (variante dQ101). El fragmento vL complementario está unido a un fragmento (SEQ ID NO: 31997) que codifica un enlazador similar a Ig derivado del TCRα fusionado al dominio bisagra, transmembrana y citosólico de CD16a. La expresión de SAR en la superficie de las

células T se examinó mediante tinción con proteína L seguida de citometría de flujo. Las células T que expresaban las construcciones con SEQ ID NO: 32292-32295 mostraron un 91%, 63%, 77% y 76% de tinción superficial con proteína L. Todas las células SAR-T mostraron una citotoxicidad eficaz y casi equivalente contra las células LNCaP (línea celular de cáncer de próstata) que expresaban Luc-PPE. La citotoxicidad se midió mediante el ensayo Matador-Glo tras un periodo de cocultivo de 24 horas y 48 horas y a proporciones E:T (Efector: Diana) de 3:1, 1:1 y 0.3:1, respectivamente. Las células T que expresan la construcción SAR con SEQ ID NO: 32292, que tiene la arquitectura de un CAR de segunda generación, mostraron una producción basal muy elevada de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ incluso cuando no estaban expuestas a las células diana, medida por ELISA. Esto se atribuyó a la señalización tónica. La secreción de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ aumentó aún más en el cocultivo con células diana LNCaP. Por el contrario, las células T que expresan el SAR con SEQ ID NO: 32293-95 mostraron una producción basal muy baja de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ y mostraron un aumento mínimo o nulo en el cocultivo con las células diana LNCaP. La actividad *in vivo* de los SAR se probó utilizando un modelo de xenoinjerto de LNCaP en ratones NSG. Se inyectaron ratones (n=5) por vía subcutánea con 1 millón de células LNCaP que expresaban Luc-PPE en Matrigel (50:50). Cinco días después, los animales fueron inyectados con 10 millones/ratón de células T de control o células SAR-T. El seguimiento de los animales se realizó mediante imágenes de bioluminiscencia. Dos de los cinco ratones que recibieron células T que expresaban el CAR (SEQ ID NO: 32292) murieron el día 20 (es decir, 15 días después de la inyección de células SAR-T). En cambio, no se observó ninguna muerte temprana en los animales a los que se administraron células T de control o células T que expresaban las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32293-95. Los ratones a los que se administraron las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32293-95 también mostraron un control tumoral eficaz y casi completo en comparación con los ratones a los que se administraron células T de control o aquellos a los que se administraron células T que expresaban la construcción CAR de 2ª generación con SEQ ID NO: 32294.

[00655] Se realizó un experimento independiente utilizando células T que expresaban las construcciones con SEQ ID NO: 32292-94. Las células T que expresan el SAR con SEQ ID NO: 32292 mostraron de nuevo una producción basal muy elevada de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$, lo que refleja una señalización tónica. La actividad *in vivo* y la seguridad se probaron utilizando el modelo de xenoinjerto LNCaP en ratones inmunodeficientes (NCG; Charles River). En este experimento, todos los ratones inmunodeficientes a los que se administraron células T que expresaban el SAR con SEQ ID NO: 32292 mostraron una mortalidad temprana en aproximadamente 20 días tras la inyección de las células T. Los ratones a los que se administraron células T que expresaban el SAR con SEQ ID NO: 32293 mostraron un control tumoral eficaz en comparación con los

animales a los que se administraron células T de control y mostraron la mejor supervivencia, ya que cuatro de los cinco animales sobrevivieron hasta el día 62 después de la inyección de células LNCaP. Los ratones a los que se administró SAR con SEQ ID NO: 32294 también mostraron un control tumoral eficaz, pero tres de los cinco animales murieron el día 62 después de la inyección del tumor.

[00656] Se construye un amplio panel de construcciones SAR adicionales dirigidas a STEAP2 y que comprenden el mismo fragmento vL (SEQ ID NO: 19776) y vH (SEQ ID NO: 19795) como dominio de unión a antígeno y se prueban mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Las construcciones SAR de ejemplo dirigidas a STEAP2 están representadas por las SEQ ID NO: 21893-21947. Las células T que expresan estos constructos SAR muestran una menor producción de TNF α e IFN γ en comparación con las células T que expresan la construcción CAR de 2^a generación representado por SEQ ID NO: 32294. Se ha construido un amplio panel de construcciones SAR de cadena híbrida en las que una o ambas cadenas TCR son cadenas híbridas. Además, se construyen SAR que comprenden el mismo fragmento vL (SEQ ID NO: 19776) y vH (SEQ ID NO: 19795) pero con deleciones en la N-terminal de una o más cadenas TCR (cadenas híbridas y no híbridas). Las células T que expresan estos CAR de cadena híbrida dirigidos a STEAP2 mostrarán una menor producción de TNF α e IFN γ en comparación con las células T que expresan la construcción CAR de 2^a generación representado por SEQ ID NO: 32294. Además, las células T que expresan estas construcciones SAR de cadena híbrida mostrarán una seguridad superior *in vivo* cuando se administren a ratones NSG inmunodeficientes. Colectivamente, estos resultados demostrarían que es posible usar cadenas TCR híbridas y/o mutantes para generar rápida y económicamente un gran panel de construcciones SAR sintonizadas por afinidad con nivel variable de afinidad por el antígeno diana y que comprenden el mismo dominio de unión a antígeno (*p.ej.*, fragmento vL y vH). El enfoque aquí descrito no se limita a SAR que comprenden fragmentos vL/vH también puede utilizarse para generar construcciones SAR sintonizadas por afinidad que comprenden cualquier dominio de unión a antígeno (*p.ej.*, vHH, FHVH, Darpin, sd-TCR, adaptador, V α , V β , V γ y V δ , etc.). Este enfoque tiene una ventaja inherente sobre el enfoque convencional de mutagénesis CDR del dominio de unión a antígeno (*p.ej.*, vL y/o fragmento vH) para generar construcciones CAR sintonizadas por afinidad, ya que el enfoque de mutagénesis CDR es caro, requiere mucho tiempo y, además, conlleva el riesgo de adquirir una nueva especificidad de antígeno.

[00657] **Actividad *in vitro* e *in vivo* de células T que expresan SARs CD70.** Se construye un amplio panel de SAR en diferentes arquitecturas que comprenden los fragmentos vL, vH y scFv representados por los SEQ ID NOs: 19768-19772, 19787-19791 y 19806-19809 y se prueban en células JNG. Las células T de sangre periférica humana aisladas mediante perlas

magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32387-32389. Estas construcciones comprenden vL, vH y fragmentos scFv representados por SEQ ID NO: 19772, 19891 y 19809, respectivamente. La construcción SAR con SEQ ID NO: 32387 es un CAR de 2ª generación. La construcción con SEQ ID NO: 32388 es un SIR de doble cadena que es similar en arquitectura al SEQ ID NO: 32770. La construcción SAR con SEQ ID NO: 32389 es una zSAR en la que los fragmentos vL y vH están enlazados operativamente a las cadenas CD3z mediante enlazadores similar a Ig derivados de las cadenas TCR β y TCR α . La expresión del SAR en células T se demuestra mediante tinción con proteína L. La citotoxicidad de las células T que expresan las diferentes construcciones de SAR se demuestra mediante el ensayo Matador-Glo tras 18 horas de cocultivo con líneas celulares 786-O y ACHN que expresan Luc-PPE. La producción de citoquinas se demuestra mediante ELISA. Las células T que expresan la construcción con SEQ ID NO: 32388 resultan ser las más potentes en términos de citotoxicidad y producción de citoquinas. La actividad *in vivo* de las diferentes células SAR-T se demuestra mediante xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de riñón 786-O (CD70^{alto}) y ACHN (CD70^{intermedio}) que expresan LucPPE en ratones NSG. Por eso, se inyectan 1 millón de células 786-O-Luc PPE por vía subcutánea en el flanco izquierdo en Matrigel y 1 millón de células ACHN-Luc PPE por vía subcutánea en el flanco derecho del mismo ratón en Matrigel. Una semana después, los animales reciben 5 millones de células T de control o células SAR-T por inyección en la vena de la cola. Las imágenes de bioluminiscencia (BLI) demuestran un control tumoral superior en los ratones a los que se administran las tres células SAR-T en comparación con los ratones a los que se administran células T de control. Los ratones a los que se administraron células T que expresan el SAR con SEQ ID NO: 32388 muestran el mejor control tumoral y supervivencia.

[00658] Se construye un amplio panel de construcciones SAR adicionales dirigidas a CD70 y que comprenden los mismos fragmentos vL y vH que los de SEQ ID NO: 32388 como dominio de unión a antígeno. Las células SAR-T se prueban mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Estas construcciones pueden utilizarse para generar una respuesta inmunitaria polifuncional y diversa. Además de las líneas celulares derivadas del cáncer de riñón, estas construcciones mostrarán actividad contra las líneas celulares de LMA que expresan CD70.

[00659] **Actividad *in vitro* e *in vivo* de células T que expresan SAR de CLDN6 (Claudina 6).** Se construye un amplio panel de SAR con diferentes arquitecturas y que comprenden los fragmentos vL, vH y scFv representados por los SEQ ID NOs: 32020-32023, 32083-32086 y 32146-32149, respectivamente, y se comprueba que muestran actividad NFAT contra las células diana que expresan CLDN6 cuando se expresan en células JNG. Las células T de sangre periférica humana aisladas mediante perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que

expresan las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32287-32291. Estas construcciones comprenden fragmentos vL representados por SEQ ID NO: 32021 y 32023, fragmentos vH representados por SEQ ID NO: 32083 y 32086 y scFv representados por SEQ ID NO: 32146 y 32149, respectivamente. Las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32287 y 32290 son CAR de 2ª generación. Las otras construcciones SAR son de arquitectura SIR de doble cadena. En la construcción con SEQ ID NO: 32289 y 32291, el fragmento vH está enlazado operativamente en el marco a una cadena TCR β humana optimizada en codones con mutación S57C (SEQ ID NO: 470) y el fragmento vL está enlazado operativamente a una cadena TCR α humana optimizada en codones con mutación T48C (SEQ ID NO: 458). En la construcción con SEQ ID NO: 32288, el fragmento vL está unido a una cadena TCR α humana optimizada en codones y murinizada con mutación T48C (SEQ ID NO: 455) y el fragmento vH está unido operativamente en marco a una cadena TCR β humana optimizada en codones y murinizada con mutación S57C (SEQ ID NO: 471). La expresión del SAR en células T se demuestra mediante tinción con proteína L. Las construcciones CAR muestran la expresión más alta. La citotoxicidad de las células T que expresan las diferentes construcciones SAR se demuestra mediante el ensayo Matador-Glo tras 24 horas de cocultivo con líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR3 y OV90 que expresan Luc-PPE, las cuales se sabe que expresan CLDN6. Las células T que expresan todas las construcciones SAR muestran un aumento de la citotoxicidad en proporciones E:T de 3:1 y 1:1. La producción de citoquinas se demuestra mediante ELISA. Las células T que expresan las construcciones CAR con SEQ ID NO: 32287 y 32290 muestran una alta producción de IFN γ y TNF α cuando se cocultivan con líneas celulares diana durante 48 h. Las construcciones SIR (SEQ ID NO: 32288, 32289, 32291) muestran una producción de citoquinas baja o insignificante. La actividad *in vivo* de las diferentes células SAR-T se demuestra mediante xenoinjerto de la línea celular de cáncer de ovario OV90 que expresa LucPPE en ratones NSG. Se inyectan 5 millones de células OV90-Luc PPE por vía subcutánea en Matrigel en el flanco de ratones macho. Dos semanas después, los animales reciben 5 millones de células T de control o células SAR-T por inyección en la vena de la cola. Las imágenes de bioluminiscencia (BLI) demuestran un control tumoral y una supervivencia superiores en los ratones que reciben todas las células SAR-T en comparación con los ratones que reciben células T de control.

[00660] Se construye un amplio panel de construcciones SAR adicionales dirigidas a CLDN6 y que comprenden los mismos fragmentos vL y vH. Las células SAR-T se prueban mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Estas construcciones pueden utilizarse para generar una respuesta inmunitaria polifuncional y diversa cuando se administran a un sujeto que los necesita.

[00661] **Expresión y actividad de células T que expresan SARs CLDN18.2.** Se construye un amplio panel de SAR con diferentes arquitecturas y que comprenden los fragmentos vL, vH y

scFv representados por los SEQ ID NOs:32018-32019, 32081-32082 y 32144-32145, respectivamente, y se comprueba que muestran actividad NFAT contra las células diana que expresan CLDN18.2 cuando se expresan en células JNG. Las células T de sangre periférica humana aisladas mediante perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32304-32307. La construcción SAR con SEQ ID NO: 32304 es un CAR de 2ª generación. Las otras construcciones SAR son de arquitectura SIR de doble cadena. La expresión del SAR en las células T se demuestra mediante tinción con proteína L. Las construcciones CAR muestran la expresión más alta. La citotoxicidad de las células T que expresan las diferentes construcciones SAR se demuestra mediante el ensayo Matador-Glo tras 24 horas de cocultivo con la línea celular de cáncer de estómago NUGC4 que expresa Luc-PPE. Las células T que expresan todas las construcciones SAR muestran una mayor citotoxicidad en proporciones E:T de 3:1 y 1:1. Las células T que expresan construcciones CAR muestran una mayor citotoxicidad en proporciones E:T de 3:1 y 1:1. Las células T que expresan las construcciones CAR con SEQ ID NO: 32304 muestran una producción elevada de IFN γ y TNF α cuando se cocultivan con líneas celulares diana durante 48 horas, tal como se mide mediante ELISA. Las construcciones SIR (SEQ ID NO:32305-32307) muestran una baja producción de citoquinas. La actividad *in vivo* de las diferentes células SAR-T se examina mediante xenoinjerto de la línea celular cancerosa NUGC4 que expresa LucPPE en ratones NSG. Se inyectan aproximadamente 0.1 millones de células NUGC4-Luc PPE por vía subcutánea en Matrigel en el flanco de ratones macho. Al día siguiente, los animales reciben 5 millones de células T de control o células SAR-T por inyección en la vena de la cola. Se utilizan imágenes de bioluminiscencia (BLI) para monitorizar el control tumoral. El experimento se repite con un panel diferente de construcciones SAR CLDN18.2 (SEQ ID NO:32349-32352) basados en la arquitectura SIR. Las células T que expresan estos constructos SAR también muestran una citotoxicidad eficaz contra las células NUGC4, medida mediante el ensayo Matador-Glo. Se construye un amplio panel de construcciones SAR adicionales dirigidas a CLDN18.2 y que comprenden los mismos fragmentos vL y vH. Las células SAR-T se prueban mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Estas construcciones pueden utilizarse para generar una respuesta inmunitaria polifuncional y diversa cuando se administran a un sujeto que los necesita.

[00662] Expresión y actividad de células T que expresan TAJ/TNFRSF19 SARs. Se genera un panel de scFvs contra TAJ/TNFRSF19 y se analizan mediante el ensayo Malibu-Glo. Se demuestra que el scFv con SEQ ID NO: 32169 se une específicamente a células 293FT transfectadas con un vector de expresión de TAJ. Se construye un amplio panel de SAR con diferentes arquitecturas y que comprende los fragmentos vL, vH y scFv representados por los SEQ ID NO: 32043, 32106, 32169 respectivamente y se comprueba que muestran actividad

NFAT contra las células diana que expresan TAJ/TNFRSF19 cuando se expresan en células JNG. Las células T de sangre periférica humana se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32347, 32348 y 32354. La construcción SAR con SEQ ID NO: 32347 es un CAR de 2ª generación. Las otras dos construcciones SAR tienen la arquitectura de SIR de doble cadena. La expresión del SAR en células T se demuestra mediante tinción con proteína L. La construcción CAR muestra la expresión más alta. La citotoxicidad de las células T que expresan las diferentes construcciones SAR se demuestra mediante el ensayo Matador-Glo tras 18 horas de cocultivo con líneas celulares HepG2 (cáncer de hígado), HuTu-80 y Huh7 que expresan Luc-PPE. Las células T que expresan todas las construcciones SAR muestran una mayor citotoxicidad en proporciones E:T de 3:1 y 1:1. Las células T que expresan construcciones CAR muestran una mayor citotoxicidad en proporciones E:T de 3:1 y 1:1. Las células T que expresan las construcciones CAR con SEQ ID NO: 32347 muestran una mayor secreción basal de IFN γ y TNF α y un aumento adicional de la secreción cuando se cocultivan con líneas celulares diana durante 48 horas. Las construcciones SIR con SEQ ID NO: 32349 y 32354 muestran una producción basal baja de citoquinas y un aumento insignificante al cultivar con HepG2 y un aumento leve al cocultivar con líneas celulares Huh7. Ambas construcciones SIR muestran un aumento de la producción de IFN γ y TNF α tras el cocultivo con células HuTu-80. Se construye un amplio panel de construcciones SAR adicionales dirigidos a TAJ/TNFRSF19 y que comprenden los mismos fragmentos vL y vH. Las células SAR-T se prueban mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Estas construcciones pueden utilizarse para generar una respuesta inmunitaria polifuncional y diversa cuando se administran a un sujeto que las necesita.

[00663] Expresión y actividad de células T que expresan SARs contra GD2. Se generó un panel de scFv contra GD2 y se analizó mediante el ensayo Malibu-Glo. Se construye un amplio panel de SAR con diferentes arquitecturas y que comprende los fragmentos vL, vH y scFv representados por los SEQ ID NO: 32014-32017, 32077-32080, 32140-32143 respectivamente y se comprueba que muestran actividad NFAT contra las células diana que expresan GD2 cuando se expresan en células JNG. Las células T de sangre periférica humana se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32296-32299. Las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32296 y 32298 son CAR de 2ª generación. Las otras construcciones SAR tienen la arquitectura de SIR de doble cadena. La expresión del SAR en células T se examina mediante tinción con proteína L. Las construcciones CAR muestra la expresión más alta. La citotoxicidad de las células T que expresan las diferentes construcciones SAR se demuestra mediante el ensayo Matador-Glo tras 48 horas de cocultivo con líneas celulares SK-MEL (melanoma), A375 (melanoma) y SH-SY5Y (neuroblastoma) que expresan Luc-PPE. Las

células T que expresan todas las construcciones CAR muestran un aumento de la citotoxicidad a una proporción E:T de 1:1. Las células T que expresan las construcciones CAR con SEQ ID NO: 32296 y 32298 muestran una mayor secreción de IFN γ y TNF α cuando se cocultivan con líneas celulares diana durante 48 horas. Las construcciones SIR con SEQ ID NO: 32297 y 32299 muestran una baja producción basal de citoquinas y un aumento insignificante al cultivarse con células diana. Se construye un amplio panel de construcciones SAR adicionales dirigidos a GD2 y que comprenden los mismos fragmentos vL y vH. Las células SAR-T se prueban mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Estas construcciones pueden utilizarse para generar una respuesta inmunitaria polifuncional y diversa cuando se administran a un sujeto que las necesita.

[00664] Las células NK que expresan CD19 SAR muestran una actividad eficaz contra el modelo de xenoinjerto NALM6 en ratones.

[00665] Se construyeron varios SAR dirigidos a CD19 en vectores lentivirales (SEQ ID NO: 4-6, 24) que comprendían fragmentos vL y vH de un CD19 monoclonal humanizado hu-mROO5-1 representado por SEQ ID NOs 339 y 363 respectivamente. Estas construcciones están representadas por SEQ ID NO: 32315-32321. La construcción con SEQ ID NO: 32315 es un CAR de 2^a generación. El SAR con SEQ ID NO: 32316 es un CD16-SAR de cadena simple en el que el scFv CD19 se une en marco al N-terminal de una variante CD16a humana. Las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32317-32321 son SAR de doble cadena en las que el fragmento vL se une a un fragmento (SEQ ID NO: 946) que codifica un enlazador similar a Ig derivado del TCR β que se une en el marco al CD3z (variante dQ101). El fragmento vH complementario está unido a un fragmento (SEQ ID NO: 31997) que codifica un enlazador similar a Ig derivado del TCR α que está unido en el marco al dominio bisagra, transmembrana y citosólico del CD16a humano. Las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32318-32321 también comprenden módulos accesorios que codifican para IL15 soluble (sIL15) (SEQ ID NO: 31996), una variante de IL15 anclada en membrana (SEQ ID NO: 908), 41BBL y CD48 (SEQ ID NO: 32001), respectivamente. Las construcciones se pseudotipificaron con la envoltura de babuino modificada (072622-SyCD2; SEQ ID NO: 95). La sangre se obtuvo de un donante varón sano. Células NK primarias infectadas con diferentes construcciones SAR CD19 y pseudotipadas con la envoltura de babuino modificada (072622-SyCD2; SEQ ID NO: 95). Las células se expandieron en placas GRex durante 5-7 días. La tinción con proteína L mostró que el 52%, 55%, 62%, 45%, 51%, 49% y 31% de las células NK mostraban expresión de las construcciones SAR representadas por SEQ ID NO: 32315-32321. El ensayo de citotoxicidad Matador-Glo mostró una destrucción eficaz de las células diana RS4;11 y NALM6 por parte de las células NK que expresaban todas las construcciones SAR en proporciones E:T de 3:1 y 1:1. En general, las construcciones SAR con SEQ ID NO: 32317-32320 mostraron mayor citotoxicidad en el ensayo

Matador-Glo y mayor secreción de TNF α e IFN α tras el cocultivo con las células diana en comparación con la construcción CAR de 2ª generación representado por SEQ ID NO: 32315.

[00666] Se obtuvieron ratones NSG de 9 semanas de edad que expresaban IL15 humana (NSG-hIL15) del Laboratorio Jackson. A los ratones se les inyectaron 0,1 millones de células NALM6-LucPPE por la vena de la cola. Un día después, los ratones (n=4) fueron inyectados por la vena de la cola con 10 millones de células NK que expresaban las diferentes construcciones SAR. Las células NK restantes se congelaron. Los ratones recibieron una segunda y una tercera inyección de células NK-SAR 7 y 16 días después de la primera inyección. El crecimiento tumoral se monitorizó mediante BLI. Los ratones a los que se administraron células NK que expresaban todas las construcciones SAR mostraron un mejor control tumoral y supervivencia en comparación con los ratones a los que se administraron células NK de control que carecían de SAR. Los ratones a los que se administraron células NK que expresaban la construcción SAR representado por SEQ ID NO: 32319 mostraron un control tumoral completo en los 4 animales y la mejor supervivencia hasta el día 50. Los ratones a los que se administraron células NK que expresaban la construcción SAR representada por la SEQ ID NO: 32316 mostraron la siguiente mejor supervivencia y 3 de los 4 animales sobrevivieron hasta el día 50.

[00667] Las células T que expresan SARs CSF1R inducen citotoxicidad en células que expresan CSF1R. Las células T de sangre periférica humana aisladas mediante perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR (*p.ej.*, SEQ ID NO: 20036-20353) dirigidas al CSF1R. Las células SAR-T se expanden *in vitro* durante 10-14 días. Las células K562 y HepG2 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes SAR en una proporción E:T de 10:1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células SAR-T se evalúa mediante el ensayo Matador midiendo la actividad GLuc. La actividad *in vivo* de los SARs se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG. Los SAR CSF1R se utilizan para el tratamiento de pacientes con enfermedades fibróticas, incluida la EICH crónica.

[00668] Las células T que expresan SARs HLA-A2 inducen citotoxicidad en células que expresan HLA-S2. Las células T de sangre periférica humana se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR (*p.ej.*, SEQ ID NO: 32705-06) dirigidas a **HLA-A2**. Las células SAR-T se expanden *in vitro* durante 10-14 días. Las células U266 y L363 que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes SAR en una proporción E:T de 10:1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células SAR-T se evalúa mediante el ensayo Matador midiendo la actividad GLuc.

[00669] Las células T que expresan SARs de p53 mutante (R248Q) y (R175H) inducen citotoxicidad en células HLA-A2 que expresan p53 mutante (R248Q). Las células T de

sangre periférica humana aisladas mediante perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR (*p.ej.*, SEQ ID NO: 3816-3872 y 3768, 3905) dirigidas a p53 mutante (R248Q) o R175H. Las células SAR-T se expanden *in vitro* durante 10-14 días. Las células T2 que expresan GLuc de forma estable y cargadas con los péptidos p53 mutantes se cocultivan con células T que expresan los diferentes SAR en una proporción E:T de 10:1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células SAR-T se evalúa mediante el ensayo Matador midiendo la actividad GLuc. La actividad *in vivo* de los SAR se demuestra utilizando un modelo de xenoinjerto en ratones NSG.

[00670] Las células T que expresan SARs de KLK2 inducen citotoxicidad en células que expresan KLK2. Las células T de sangre periférica humana aisladas mediante perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR (*p.ej.*, SEQ ID NO: 1015-1016) dirigidas a KLK2. Las células SAR-T se expanden *in vitro* durante 10-14 días. Las células LNCaP que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes SAR en una proporción E:T de 10:1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células SAR-T se evalúa mediante el ensayo Matador midiendo la actividad GLuc.

[00671] Las células T que expresan SARs GPRC5D inducen citotoxicidad en células que expresan GPRC5D. Las células T de sangre periférica humana se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR uniespecíficas y biespecíficas (*p.ej.*, SEQ ID NO: 35904-36000) dirigidas a GPRC5D. Las células SAR-T se expanden *in vitro* durante 10-14 días. Las células L363 y MM1s que expresan GLuc de forma estable se cocultivan con células T que expresan los diferentes SAR en una proporción E:T de 10:1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células SAR-T se evalúa mediante el ensayo Matador midiendo la actividad GLuc.

[00672] Las células JNG que expresan MHC-SAR responden a las células T que expresan un TCR dirigido a RQ13

[00673] Los MHC-SAR (SEQ ID NO: 23780-23794) dirigidos a los TCR que se unen al complejo RQ13/HLA-DR se expresan en células JNG. Las células JNG que expresan el SAR pueden reconocer células T que expresan un TCR (SEQ ID NO: 23236 que se une al complejo RQ13/HLA-DR e induce la expresión de GFP. Se repite el experimento expresando los MHC-SAR en células T primarias que reconocen a las células T que expresan el TCR (SEQ ID NO (DNA): 23236. En otro ejemplo, las células NK primarias que expresan el SAR (SEQ ID NO: 23780-23787) reconocen las células T que expresan el TCR SEQ ID NO (DNA): 23236.

[00674] Las células T que expresan cadenas híbridas de TCR dirigidas al complejo NY-ESO-1/HLA-A2 inducen citotoxicidad contra las células diana con expresión de péptido

NY-ESO-1/HLA-A2. Las células T de sangre periférica humana aisladas mediante perlas magnéticas CD3 se infectan con lentivirus que expresan las construcciones SAR (*p.ej.*, SEQ ID NO: 19760-61) dirigidos contra NY-ESO-1/HLA-A2. Las células SAR-T se expanden *in vitro* durante 10-14 días. Las células T2 y L363 que expresan GLuc de forma estable se cargan con el péptido NY-ESO-1 y luego se cocultivan con células T que expresan los diferentes SAR en una proporción E:T de 10:1 durante 48 horas. La inducción de lisis de células diana mediada por células SAR-T se evalúa mediante el ensayo Matador midiendo la actividad GLuc.

[00675] SAR con cadenas $\alpha\beta$ TCR expresadas en células $\gamma\delta$ T

[00676] Una construcción SAR dirigida a CD8SP-CD19-hu-mROO5-1-vL-[hTCRb-opt2]-F-P2A-SP-CD19-hu-mROO5-1-vH-[hTCRa-opt2]-F-F2A-PAC (SEQ ID NO: 3258) que comprende vL y vH del anticuerpo hu-mROO5-1 unido a la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de las cadenas constantes TCRb y TCRa, respectivamente, se expresa en células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. Las cadenas TCRb y TCRa de esta construcción están compuestas por su secuencia humana optimizada en codones. La construcción muestra una buena expresión y actividad cuando se expresa en células T $\gamma\delta$.

[00677] Utilización de células tratadas con mitomicina para el ensayo Matador

[00678] Se cocultivan células NK-92 y células NK primarias con K562-LucPPE (UT, tratadas con mitomicina C a 30 μ g/ml durante 1 hora o irradiadas a 100Gy) en proporción E:T 0.3:1 y E:T 1:1 durante 3 h. Se mide el aumento de la actividad Luc mediante la adición de tampón que contiene D-luciferina como se describe para el ensayo Matador-Glo. Los resultados muestran que las células irradiadas o con mitomicina pueden utilizarse en el ensayo Matador.

[00679] EMBODIMENTOS

1. Un SAR que comprende al menos dos cadenas en las que

a) una primera cadena polipeptídica comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende un dominio vL, un dominio V α o un dominio V γ y un primer módulo asociado a membrana (MAM); y

b) una segunda cadena polipeptídica comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende un dominio vH, un dominio V β o un dominio V δ y un segundo módulo asociado a membrana (MAM);

en el que el dominio vL, V α o V γ del primer dominio de unión a antígeno y el dominio complementario vH, V β o V δ del segundo dominio de unión a antígeno forman un módulo de unión a antígeno similar a Fv o TCR-Fv que se une específicamente al antígeno diana; y

en el que la primera MAM y la segunda MAM forman un módulo receptor de células no T (NTCRM) capaz de activar al menos una vía de señalización y/o reclutar al menos un adaptador de señalización; y

en la que una o ambas MAM comprenden una secuencia con SEQ ID NO:8925-8948, 9310-9321, 9323-9346 o una secuencia con al menos un 70% de homología con la misma o una variante funcional de cualquiera de las anteriores y sus fragmentos.

2. El SAR de la realización 1, en la que la primera cadena polipeptídica comprende además un primer enlazador peptídico entre el primer dominio de unión a antígeno y la primera MAM, y la segunda cadena polipeptídica comprende además un segundo enlazador peptídico entre el segundo dominio de unión a antígeno y la segunda MAM.

3. El SAR de la realización 2, en la que el primer y/o segundo enlazador peptídico comprenden, individualmente, un dominio constante o fragmento del mismo de una subunidad de inmunoglobulina o receptor de células T.

4. El SAR de la realización 3, en la que el primer y/o segundo enlazador peptídico comprenden, individualmente, un dominio de anticuerpo CH1, CH2, CH3, CH4 o CL, o un fragmento del mismo.

5. El SAR de la realización 4, en la que el primer y/o segundo enlazador peptídico comprenden, individualmente, un dominio TCR C α , C β , C γ o C δ , o un fragmento del mismo.

6. El SAR de las realizaciones 3 o 4, en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están unidas mediante uno o más enlaces disulfuro.

7. El SAR de la realización 4, en la que el primer y/o segundo enlazador peptídico comprenden mutaciones que aumentan la expresión, afinidad y/o emparejamiento de las dos cadenas polipeptídicas.

8. El SAR de la realización 4, en la que el primer y/o segundo enlazador peptídico comprende una secuencia como la establecida en cualquiera de los SEQ ID NO: 8961-8994 y 21466-21471 o una secuencia con al menos un 70% de identidad con la misma.

9. El SAR de la realización 3, en la que el primer polipéptido comprende además un primer dominio bisagra o fragmento del mismo N-terminal a la primera MAM; y/o en la que el segundo polipéptido comprende además un segundo dominio bisagra o fragmento del mismo N-terminal a la segunda MAM.

10. Un SAR de la realización 1, que comprende un enlace disulfuro entre un residuo en la primera MAM y la segunda MAM y/o un residuo en el primer dominio bisagra y un residuo en el segundo dominio bisagra.

11. Un SAR de la realización 1, en la que el primer polipéptido comprende además un primer dominio de unión a antígeno homólogo o fragmento del mismo N-terminal al primer dominio bisagra y/o el segundo polipéptido comprende además un segundo dominio de unión a antígeno homólogo o fragmento del mismo N-terminal al segundo dominio bisagra, en el que los

dos dominios de unión a antígeno homólogos se derivan del mismo receptor natural de células no T que los dominios bisagra correspondientes.

12. Un SAR de la realización 1, en la que el primer polipéptido comprende además un primer dominio citosólico que contiene un dominio de activación opcional C-terminal al primer dominio de anclaje transmembrana/membrana que comprende la primera MAM; y/o en la que el segundo polipéptido comprende además un segundo dominio citosólico que contiene un dominio de activación opcional C-terminal al segundo dominio de anclaje transmembrana/membrana que comprende la segunda MAM.

13. El SAR de la realización 1, en la que la primera cadena polipeptídica comprende además un primer dominio intracelular accesorio que comprende una secuencia de dominio coestimulador o coreceptor C-terminal al primer dominio de anclaje transmembrana/membrana de la primera MAM; y/o en la que la segunda cadena polipeptídica comprende además un segundo dominio intracelular accesorio que comprende una secuencia de dominio coestimulador, coreceptor o una molécula de señalización C-terminal al segundo dominio de anclaje transmembrana/membrana que comprende la segunda MAM.

14. Un SAR de la realización 13, en el que el a) dominio coestimulador se selecciona del dominio citosólico de CD28, 4-1BB, OX40, 2B4, CD27, CD81, CD2, CD5, BAFF-R, CD30, CD40, HVEM o ICOS, o una variante o un fragmento de los mismos; y b) el dominio coreceptor se selecciona del dominio citosólico de CD8a, CD8b o CD4, o una variante o un fragmento del mismo y c) la molécula señalizadora es una cinasa seleccionada opcionalmente del grupo de Lck, FYN, ZAP-70, PLC γ 1, SLP-76 y LAT o una variante funcional o un fragmento del mismo.

15. Un SAR de la realización 1, en el que el primer y/o el segundo MAM y el NTCRM están formados por el dominio de anclaje transmembrana/membrana, el dominio citosólico opcional, el dominio bisagra opcional y/o el dominio extracelular opcional de un receptor de células no T y/o un adaptador de señalización.

16. Un SAR de la realización 15, en la que el primer y/o el segundo MAM y el NTCRM comprenden el dominio de anclaje transmembrana/membrana, el dominio citosólico opcional, el dominio bisagra opcional y/o el dominio extracelular opcional que se derivan todos de un único receptor de células no T y/o un adaptador de señalización o variantes de los mismos.

17. Un SAR de la realización 15, en la que el primer y/o el segundo MAM y el NTCRM están formados por el dominio de anclaje transmembrana/membrana, el dominio citosólico opcional, el dominio bisagra opcional y/o el dominio extracelular opcional que se derivan de diferentes receptores de células no T y/o un adaptador de señalización o variantes de los mismos.

18. Un SAR de la realización 15, en la que los dos dominios de anclaje transmembrana/membrana, los dominios citosólicos opcionales, los dominios coestimuladores

opcional, los dominios bisagra opcionales y/o los dominios extracelulares opcionales son idénticos en secuencia y se derivan de la misma proteína.

19. Un SAR de la realización 15, en la que los dos de anclaje transmembrana/membrana, los dominios citosólicos opcionales, los dominios coestimuladores opcional, los dominios bisagra opcionales y/o los dominios extracelulares opcionales son diferentes en secuencia y/o se derivan de proteínas diferentes.

20. Un SAR de la realización 15, en el que

a. El receptor de células no T es un receptor natural y se selecciona del grupo formado por: CD16A, CD16B, CD64, CD32, NKp30, NKp44, NKp46, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL4, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1, NKG2D, NKG2C, NKG2A, NKG2E, NKG2F, DNAM-1, 2B4, OX40, CD28, 4-1BB, CD27, CD81, CD2, CD5, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, CRTAM, TIGIT, CD96, SLAMF6, SLAMF7, CD100, CD160, CEACAM, ILT2, KLRG1, LAIR1, CD161, una variante de cualquiera de los anteriores, y fragmentos de los mismos; y

b. El adaptador de señalización se selecciona del grupo que consiste en: CD3 ζ , FcR γ , DAP10, una variante de cualquiera de los anteriores y fragmentos de los mismos.

21. Un SAR de la realización 20, en la que a) CD16 carece de un dominio citosólico parcial o completo y/o comprende una mutación en el dominio transmembrana; y/o b) uno o ambos dominios citosólicos de CD3 ζ comprende una delección del residuo Q101; c) de ambos a) y b).

22. Un SAR de la realización 1, en la que uno o más dominios autónomos de unión a antígeno (AABD) o fragmentos de los mismos están unidos operativamente al N-terminal o cerca del N-terminal del dominio vL , vH , $V\alpha$, $V\beta$, $V\gamma$ y/o $V\delta$ mediante uno o más enlazadores opcionales.