

GENERACIÓN DE MODIFICADORES DEL RECEPTOR DE ANTÍGENOS QUIMÉRICO (CAR)
PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES

REFERENCIA RECÍPROCA A LA SOLICITUD RELACIONADA

5

La presente solicitud reclama prioridad bajo 35 U.S.C. § 119(e) para la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 63/489,979, presentada el 13 de Marzo de 2023, la cual se incorpora en su totalidad en la presente como referencia.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Los gliomas malignos, incluyendo los de grado IV, llamados también glioblastomas (GBM), son los tumores cerebrales malignos primarios más comunes, y se asocian con una alta morbilidad y mortalidad. La naturaleza agresiva del crecimiento infiltrativo de las células del glioma en el sistema nervioso central (SNC) imposibilita la resección total. A pesar de las mejores terapias disponibles, que incluyen la resección quirúrgica, la radioterapia, la quimioterapia y el tratamiento del tumor, la mediana de supervivencia es de tan sólo 12 a 17 meses para los pacientes con GBMs, y de 2 a 5 años para los pacientes con gliomas de grado III.

20

La inmunoterapia adoptiva con células T redirigidas es una estrategia viable para tratar estos tumores malignos. Se logró una supervivencia libre de enfermedad a largo plazo en un paciente con leucemia linfocítica crónica refractaria después del tratamiento con células T autólogas modificadas con el receptor de antígenos quimérico (células T CAR) dirigidas a CD19, y se logró la remisión completa en el 90% de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) recurrente con esta estrategia. Sin embargo, hasta la fecha, la actividad anti-tumoral de las células T CAR en tumores sólidos ha sido mucho más modesta. Se usaron previamente células T CAR humanizadas anti-EGFR variante III (EGFRvIII) (2173BBz) en una prueba clínica de fase I (NCT02209376) de 10 pacientes con GBM recurrente. Hubo cambios obvios en el microambiente tumoral después de la infusión de células T CAR, incluyendo la reducción del antígeno objetivo EGFRvIII asociado con el tráfico de células T CAR y la activación funcional *in situ*. Sin embargo, el estudio no contó con la potencia estadística suficiente para determinar la respuesta clínica (la mediana de supervivencia global fue de 251 días). Un reporte reciente describió el uso de infusiones intratumorales e intratecales repetidas de células T redirigidas que expresaban una zetacina de IL13 (una citocina de IL13 mutada), fusionada con un dominio de señalización de células T en un sólo paciente con GBM multifocal recurrente, lo que llevó a una regresión completa del tumor por 7.5 meses.

35

El receptor $\alpha 2$ de la interleucina 13 (IL13R $\alpha 2$) se expresa en diferentes tipos de

tumores humanos, pero no se observa su expresión en tejidos humanos normales, salvo en los testículos del adulto. La señalización de IL13 a través de IL13R α 2 desempeña una función crucial en la migración e invasión de células. Un estudio previo halló que el 82% de los casos de GBM expresaban IL13R α 2. Los anticuerpos neutralizantes y los anticuerpos conjugados con fármacos dirigidos a IL13R α 2 inhibieron el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de ratón. La vacuna tumoral basada en IL13R α 2 benefició también a los pacientes pediátricos con glioma. Aunque las células T redirigidas por la zetacina de IL13 se unen a IL13R α 2 e inducen una respuesta clínica limitada, se unen también a IL13R α 1, que se expresa en algunos tejidos humanos normales y ha demostrado efectos adversos fuera del objetivo.

La heterogeneidad tumoral y el microambiente tumoral inmunosupresor (TME) constituyen obstáculos importantes para la terapia con células T con receptores de antígenos quiméricos (CARs) en el GBM. La reducción específica de sitio en EGFRvIII tras la terapia con células T CAR es coherente con la heterogeneidad intratumoral observada de esta alteración en el GBM. Cabe destacar que el análisis inmunohistoquímico del tejido demostró la presencia de una respuesta adaptativa en el TME del GBM que siguió de cerca la secuencia temporal de activación de las células T CAR. IDO1, PD-L1, IL10 y TGF β aumentaron en el tejido tumoral proximal a las células T CAR después del tratamiento. Estas vías inmunorreguladoras desempeñan una función importante en la evasión de la inmunidad tumoral en varios ambientes, y sugieren que se desarrolla una resistencia adaptativa en el GBM que debilita aún más las respuestas inmunes dentro del tumor.

Existe la necesidad en la técnica por mejorar las terapias con células T CAR dirigidas a múltiples antígenos, y que interrumpan las señales inmunosupresoras dentro del TME. La presente invención aborda y satisface esta necesidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Como se describe en la presente, la presente invención se refiere a células inmunes modificadas o precursores de las mismas (por ejemplo, células T) que comprenden un primer receptor de antígenos quimérico (CAR) capaz de unirse a IL13R α 2 de humano, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII).

Se proveen también composiciones y métodos de tratamiento.

En un aspecto, la invención incluye un ácido nucleico que comprende:

una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a IL13R α 2 de humano, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular,

una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR que

comprende un segundo dominio de unión a antígeno que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, y

- 5 una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII).

En ciertas modalidades, el primer y/o segundo dominio de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un Fab, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), o un anticuerpo de un sólo dominio.

- 10 En ciertas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNALMS (SEQ ID NO: 3), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4); y

una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7).

En ciertas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9.

En ciertas modalidades, el primer dominio de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10 u 11.

En ciertas modalidades, la primera secuencia de polinucleótidos codifica para un CAR que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23, 24, 42 o 43.

En ciertas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos

GYISYSGNTRYNPSLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGFPYW (SEQ ID NO: 27); y

una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30).

En ciertas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

En ciertas modalidades, el segundo dominio de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o 71.

En ciertas modalidades, la segunda secuencia de polinucleótidos codifica para un CAR que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 35 o 75.

En ciertas modalidades, el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 77 o 79.

En ciertas modalidades, el dominio de transmembrana se selecciona del grupo que consiste en una secuencia hidrofóbica artificial, y un dominio de transmembrana de una proteína de transmembrana de tipo I, una cadena alfa, beta o zeta de un receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) y CD154, o un dominio de transmembrana derivado de un receptor tipo inmunoglobulina asesina (KIR).

En ciertas modalidades, el dominio de transmembrana comprende un dominio de transmembrana de CD8.

En ciertas modalidades, el dominio de transmembrana de CD8 es un dominio de transmembrana de CD8 alfa.

En ciertas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización intracelular.

En ciertas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio co-estimulador

de una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteínas de la superfamilia del TNFR, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS, NKG2C y B7-H3 (CD276), o una variante de las mismas, o un dominio intracelular derivado de un receptor tipo inmunoglobulina asesina (KIR).

5 En ciertas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio co-estimulador de 4-1BB.

En ciertas modalidades, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio intracelular seleccionado del grupo que consiste en dominios de señalización citoplásmica de una cadena de CD3 zeta humana (CD3ζ), FcγRIII, FcγRI, una cola citoplásmica de un receptor de Fc, un
10 receptor citoplásmico que lleva un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM), TCR zeta, FcR gamma, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d, o una variante de los mismos.

En ciertas modalidades, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio intracelular de CD3ζ.

15 En otro aspecto, la presente invención incluye un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de antígenos quimérico (CAR) capaz de unirse a IL13Rα2, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGFβ negativo dominante (DN-TGFβRII),

20 en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos
25 DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4); y

una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO:
30 7).

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%,
35 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9.

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno es un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10 u 11.

En ciertas modalidades, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23, 24, 42 o 43.

En ciertas modalidades, el DN-TGFβRII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto, la presente invención incluye un ácido nucleico que comprende:

una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, y

una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGFβ negativo dominante (DN-TGFβRII).

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno es un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o 71.

En ciertas modalidades, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23, 24, 35, 42, 43 o 75.

En ciertas modalidades, el DN-TGFβRII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NOs: 81, 83 u 85.

En otro aspecto, la presente invención incluye un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13Rα2, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGFβ negativo dominante (DN-TGFβRII), en donde:

el primer CAR comprende un dominio de unión a antígeno que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos
5 GVKWAGGSTDYNALMS (SEQ ID NO: 3), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4); y

una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos
10 STSNLAS (SEQ ID NO: 6), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7), y

en donde el segundo CAR comprende un dominio de unión a antígeno que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos
15 GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNPSLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGPYW (SEQ ID NO: 27); y

una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos
20 HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30), y

en donde el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

25 En otro aspecto, la presente invención incluye un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13Ra2, una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un DN-TGF β RII, en donde:

30 el primer CAR comprende:

una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 44 o 54;
y

una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos
35 por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 48 o 58;

y

el segundo CAR comprende:

una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 73; y

5 una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 74.

En otro aspecto, la presente invención incluye un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13Ra2, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un DN-TGFβRII, en donde:

el primer CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 64, 65, 66 o 69; y

15 el segundo CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 70.

En otro aspecto, la presente invención incluye un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer receptor de antígenos quimérico capaz de unirse a IL13Ra2, una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo receptor de antígenos quimérico (CAR) capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un DN-TGFβRII, en donde:

la primera secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63; y

la segunda secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 34.

En ciertas modalidades, el DN-TGFβRII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2, o es codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 14.

En ciertas modalidades, la primera secuencia de polinucleótidos y la segunda secuencia de polinucleótidos están separadas por un enlazador.

35 En ciertas modalidades, la segunda secuencia de polinucleótidos y la tercera secuencia

de polinucleótidos están separadas por un enlazador.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico comprende de 5' a 3' la segunda secuencia de polinucleótidos, un enlazador y la primera secuencia de polinucleótidos.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico comprende de 5' a 3' la segunda secuencia de polinucleótidos, un enlazador, la primera secuencia de polinucleótidos, un enlazador y la tercera secuencia de polinucleótidos.

En otro aspecto, la presente invención incluye un vector que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las cláusulas anteriores.

En ciertas modalidades, el vector es un vector de expresión.

En ciertas modalidades, el vector se selecciona del grupo que consiste en un vector de ADN, un vector de ARN, un plásmido, un vector lentiviral, un vector adenoviral, un vector viral adeno-asociado y un vector retroviral.

En ciertas modalidades, el vector de los aspectos o modalidades anteriores o cualquier aspecto para la modalidad descrita en la presente comprende además un promotor de EF-1a.

En ciertas modalidades, el vector de los aspectos o modalidades anteriores o cualquier aspecto para la modalidad descrita en la presente comprende además un elemento regulador post-transcripción del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).

En ciertas modalidades, el vector de los aspectos o modalidades anteriores o cualquier aspecto para la modalidad descrita en la presente comprende además un elemento de respuesta rev (RRE).

En ciertas modalidades, el vector de los aspectos o modalidades anteriores o cualquier aspecto para la modalidad descrita en la presente comprende además una secuencia de cPPT.

En ciertas modalidades, el vector es un vector de auto-inactivación.

En otro aspecto, la presente invención incluye una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las cláusulas 1 a 38, o el vector de conformidad con cualquiera de las cláusulas 39 a 46.

En otro aspecto, la presente invención incluye una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende:

un primer receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un primer dominio de unión a antígeno capaz de unirse a IL13R α 2; y

un segundo receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión a antígeno capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo;

y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII).

En otro aspecto, la presente invención incluye una célula inmune modificada o una

célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

el primer CAR comprende:

5 una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1) o SRNGMS (SEQ ID NO: 12), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3) o TVSSGGSYIYADSVKG (SEQ ID NO: 13), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4) o QGTTALATRFFDV (SEQ ID NO: 15); y

10 una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5) o KASQDVGTAVA (SEQ ID NO: 16), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6) o SASYST (SEQ ID NO: 17), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7) o QHHYSAPWT (SEQ ID NO: 18); y

el segundo CAR comprende:

20 una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNPSLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGFPYW (SEQ ID NO: 27); y

25 una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30).

30 En otro aspecto, la presente invención incluye una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

el primer CAR comprende:

35 una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8 o 19; y/o

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9 o 20; y

el segundo CAR comprende:

5 una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31; y/o

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

10 En otro aspecto, la presente invención incluye una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

15 el primer CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10 u 11; y

el segundo CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o 71.

20 En otro aspecto, la presente invención incluye una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

25 el primer CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23, 24, 42 o 43; y

el segundo CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 35 o 75.

30 En otro aspecto, la presente invención incluye una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

el primer CAR comprende:

una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 44 o 54; y

35 una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos

por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 48 o 58;
y

el segundo CAR comprende:

- una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos
5 por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 73; y
una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos
por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 74.

- En otro aspecto, la presente invención incluye una célula inmune modificada o una
célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo
10 CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo
dominante (DN-TGF β RII), en donde:

el primer CAR comprende un scFv codificado por una secuencia de polinucleótidos por
lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 64, 65, 66 o
69; y

- 15 el segundo CAR comprende un scFv codificado por una secuencia de polinucleótidos
por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 70.

- En otro aspecto, la presente invención incluye una célula inmune modificada o una
célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo
CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo
20 dominante (DN-TGF β RII), en donde:

la primera secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%,
85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 o SEQ
ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63; y

- la segunda secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%,
25 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 34.

En ciertas modalidades, el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por
lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2, o es
codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%,
98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 14.

- 30 En ciertas modalidades, el segundo CAR es capaz de unirse a una isoforma de EGFR
seleccionada del grupo que consiste en EGFR de tipo silvestre (wtEGFR), EGFR mutado, EGFR^{A289V},
EGFR^{A289D}, EGFR^{A289T}, EGFR^{A289T}, EGFR^{R108K}, EGFR^{R108G}, EGFR^{G598V}, EGFR^{D126Y}, EGFR^{C628F}, EGFR^{R108K/A289V},
EGFR^{R108K/D126Y}, EGFR^{A289V/G598V}, EGFR^{A289V/C628F} y variante II del EGFR, o cualquier combinación de los
mismos.

- 35 En ciertas modalidades, la célula modificada es una célula T modificada.

En ciertas modalidades, la célula modificada es una célula autóloga.

En ciertas modalidades, la célula modificada es una célula autóloga obtenida de un sujeto humano.

En ciertas modalidades, el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto, la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la célula modificada de cualquiera de las cláusulas 47 a 61.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar una enfermedad en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la célula modificada de cualquiera de las cláusulas 47 a 61, o la composición farmacéutica de la cláusula 62.

En ciertas modalidades, la enfermedad es un cáncer.

En ciertas modalidades, el cáncer es un glioma.

En ciertas modalidades, el cáncer es un astrocitoma.

En ciertas modalidades, el cáncer es un astrocitoma de alto grado.

En ciertas modalidades, el cáncer es un glioblastoma.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende:

un primer receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un primer dominio de unión a antígeno capaz de unirse a IL13R α 2; y

un segundo receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión a antígeno capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo; y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII).

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

el primer CAR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1) o SRNGMS (SEQ ID NO: 12), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNALMS (SEQ ID NO: 3) o TVSSGGSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 13), y

HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4) o QGTTALATRFFDV (SEQ ID NO: 15); y

el segundo CAR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNPSLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGFPYW (SEQ ID NO: 27); y

una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30).

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

el primer CAR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8 o 19; y

una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9 o 20; y

el segundo CAR comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

el primer CAR comprende un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22, y

5 el segundo CAR comprende un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o 71.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo
10 dominante (DN-TGF β RII), en donde:

el primer CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43; y

15 el segundo CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 35 o 75.

En ciertas modalidades, el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2, o es codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 14.

20 En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

25 el primer CAR comprende:

una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 44 o 54;
y

30 una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 48 o 58;
y

el segundo CAR comprende:

una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 73; y

35 una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos

por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 74.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR
5 capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

el primer CAR comprende un scFv codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 64, 65, 66 o 69; y

10 el segundo CAR comprende un scFv codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 70.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR
15 capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde:

el primer CAR comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63; y

20 el segundo CAR comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 34.

En ciertas modalidades, el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2, o es codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%,
25 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 76 o 78.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las anteriores y otras características y ventajas de la presente invención se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de modalidades
35 ilustrativas tomadas en conjunto con los dibujos acompañantes.

FIG. 1: Esquema de la construcción dominante-negativa TGF β -RII CART-EGFR-IL13Ra2. Para inhibir la vía de señalización represiva, se generó un receptor II de TGF- β truncado, que carece del dominio de cinasa intracelular en el residuo 199as, lo que le impide fosforilar señales hacia el extremo 3'. Este se integró en una construcción que comprende un CAR paralelo dirigido al EGFR e IL13Ra2, para superar el doble desafío de la heterogeneidad antigénica y el microambiente tumoral supresor.

FIGs. 2A-2D: El TGF β 1 se expresa en gran medida en el GBM. FIG. 2A: Expresión del TGF β 1 segregada por la histología del glioma según datos de secuenciación de ARN de la base de datos Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA). El eje Y indica los niveles de expresión relativos de cada caso. FIG. 2B: Curva de supervivencia global para el grupo de expresión de TGF β 1 alto y bajo de acuerdo con la base de datos Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), calculado por cuartil superior e inferior de la expresión de TGF β 1 en el análisis de Kaplan-Meier. FIG. 2C: El TGF β 1 se expresa en las líneas de células de GBM. Las diferentes líneas de células de glioblastoma se cultivaron a una densidad de 3e6 células por matraz por 3 días. Se recolectó el medio acondicionado para analizar la secreción de TGF β latente por las líneas de células de glioblastoma. PC3 es una de las líneas de células que ha demostrado tener un alto nivel de secreción, lo que la compara con las líneas de células de GBM como control positivo. FIG. 2D: Tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-TGF- β 1 en secciones de tejido de ratones NSG con gliomas U87 y D270 implantados intracranealmente. Las secciones de bazo y corteza cerebral se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon mediante la prueba de Kruskal-Wallis: **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

FIGs. 3A-3D: Células T que expresan la construcción dnTGF β RII bloquean la señalización inmunosupresora de TGF- β . FIG. 3A: Mapas de vectores esquemáticos de las construcciones del CAR 806-Hu07-dnTGF β RII, 806-Hu07-mCherry y dnTGF β RII-M5. 806Hu07mCherry sirvió como control correspondiente, y el dnTGF β RII-M5 es un CAR de mesotelina que contiene el dnTGF β RII que se usó como control negativo relevante. FIG. 3B: Detección de la transducción de células T mediante citometría de flujo. Las células T fueron transducidas con vectores lentivirales. La expresión de las células T CAR fue aproximadamente igual en los tres grupos. La expresión del receptor II del TGF se analizó en células T CAR con un anticuerpo anti-TGF β . La expresión fue de alrededor del 35% del CAR con dnTGF β RII. Esto confirmó que el CAR y el TGF β RII negativo dominante se expresaron con éxito en células T. La fila superior está teñida para la expresión del CAR por la proteína L biotinilada; la fila inferior está teñida para el TGF β RII. FIGs. 3C y D: La inducción de señales de TGF- β de cada grupo se evaluó a través de Smad2/3 fosforilado intracelular, y se cuantificó en (D). dnTGF β RII bloquea la señalización inmunosupresora de TGF β en CAR-806-Hu07.

FIGs. 4A-4B: La citotoxicidad del CAR a corto plazo no se ve afectada por dnTGF β RII

in vitro. FIG. 4A: Las células objetivo de la luciferasa U87vIII-CBG fueron co-cultivadas con células T efectores a diferentes relaciones de efector:objetivo por 16 horas, con 20 ng/ml de hTGFβ1 o sólo medio. FIG. 4B: Las células objetivo D270 fueron co-cultivadas con células T efectores por 37 horas, y se analizaron mediante impedancia axiónica.

5 FIG. 5: Las células T CAR 806Hu07dnTGFβRII exhiben una expresión reducida de PD1 en co-cultivo *in vitro*. Las células T transducidas o UTD (2×10^5 células por cavidad en 100 µl de medio R10) fueron co-cultivadas con células objetivo (2×10^5 células por cavidad en 100 µl de medio R10) en placas de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 cavidades, a 37°C con CO₂ a 5% por 20 horas. Se recolectaron las células T, y se tiñeron con CD3+PD1+, usando MFI para su análisis.

10 FIGs. 6A-6B: El TGFβ1 humano no reduce la activación de las células T CAR 806Hu07dnTGFβ *in vitro*. Fueron co-cultivadas células T transducidas o UTD (2×10^5 células por cavidad en 100 µl de medio R10) con células objetivo (2×10^5 células por cavidad en 100 µl de medio R10) en placas de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 cavidades, a 37°C con CO₂ a 5% por 16 horas. Se recolectaron las células T, y se tiñeron con CAR+CD69+ o CAR+CD25+.

15 FIG. 7: dnTGFβRII impulsó la proliferación de células T CAR con estimulación repetida. Las células T CAR fueron reestimuladas por líneas de células tumorales U87vIII con medio acondicionado o sólo con medio cada semana. Comparación de la proliferación de células T CAR entre 806-Hu07-dnTGFβ RII y 806-Hu07-mCherry que estaban en medio acondicionado o en medio sólo.

20 FIG. 8: Se recolectó el sobrenadante de las placas de co-cultivo de proliferación los días 7, 14 y 21, y entonces se almacenó a -80°C para el posterior análisis de la secreción de citocinas. Además de una mejor proliferación, las células T CAR 806-Hu07-dnTGFβRII secretaron también una mayor cantidad de citocinas efectoras que las células T CAR 806-Hu07-mCherry, incluyendo IFN-γ, FNT-α, IL-12, GM-CSF e IL-2.

FIG. 9: 806-Hu07-dnTGFβRII cambia a un fenotipo de célula efectora. FIG. 9A: Se hizo una prueba de reestimulación a largo plazo *in vitro* semanalmente, colectando y tiñendo las células T para evaluar su evolución fenotípica a lo largo del tiempo, específicamente los días 0, 14 y 21. Estos cambios se evaluaron en diferentes subgrupos: células T de memoria central (CM), sin tratamiento previo (N), efectoras (E) y de memoria efectora (EM). FIG. 9B: La alteración más notable se observó en el grupo sometido a 20 ng/ml de TGF-β1. En el día 14, las células 806-Hu07-dnTGFβRII mostraron un fenotipo de células T efectoras significativamente más pronunciado que las células T CAR 806-Hu07-mCherry ($p=0.0015$). FIG. 9C: Para el día 21, el último punto de tiempo, las células 806-Hu07-dnTGFβRII exhibieron un fenotipo de "memoria efectora" mejorado ($p = 0.0009$). FIG. 9D: Se comparó la expresión del CAR en las células T CAR 806-Hu07-dnTGFβRII y 806-Hu07-mCherry. Estas células fueron sometidas a un medio acondicionado (+) o un medio sólo (-), y esta comparación se hizo en los mismos puntos de tiempo que los descritos anteriormente. La expresión del CAR fue normalizada

25

30

35

al 41% en el día 0 para iniciar pruebas posteriores.

FIGs. 10A-10D: La construcción dnTGFβRII es segura *in vivo*. FIG. 10A: Esquema del modelo de ratón NSG D270-CBG-GFP (n = 5 por grupo). Se implantaron 5e5 células tumorales por vía subcutánea, y se trataron mediante infusión intravenosa de células T CAR en cada ratón, 7 días después de la implantación del tumor. Se realizó el BLI de la carga tumoral 3-4 días. FIG. 10B: Se midió el peso de los ratones cada 3-4 días. FIG. 10C: Se midió el tamaño del tumor con calibradores, en longitud y ancho, como área del tumor. FIG. 10D: Se comparó la regresión del tumor entre cada ratón tratado usando BLI.

FIGs. 11A-11D: Las células T CAR 806-Hu07-dnTGFβRII mejoran la erradicación de tumores de GBM *in vivo*. FIG. 11A: Esquema del modelo de ratón NSG U87vIII CBG-GFP (n = 5 por grupo). Se implantaron por vía intracraneal 5e5 células tumorales, y se trataron mediante infusión intravenosa de células T CAR en cada ratón, 8 días después de la implantación del tumor. Se realizó el BLI de la carga tumoral por 3-4 días. FIG. 11B: Las curvas de supervivencia de los ratones tratados se calcularon usando la prueba de rangos logarítmicos, con los valores p ajustados mediante la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. La supervivencia, basada en el tiempo hasta el punto final del experimento, se representó mediante una curva de Kaplan-Meier. FIGs. 11C-11D: El tamaño del tumor se comparó entre cada ratón tratado usando BLI.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20

La presente invención provee composiciones y métodos que comprenden células inmunes modificadas o precursores de las mismas (por ejemplo, células T modificadas) que comprenden un primer receptor de antígenos quimérico (CAR) capaz de unirse a IL13Rα2 de humano, un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGFβ negativo dominante (DN-TGFβR). Las composiciones y métodos provistos son útiles para tratar el cáncer (por ejemplo, glioma, astrocitoma de alto grado y glioblastoma).

El factor de crecimiento transformante β (TGFβ), el ligando para TGFβRII, y una citocina con una función bien establecida en la supresión del cáncer, se expresan en gran medida en el GBM, y aumentan tras la terapia con CART-EGFRvIII. Se han atribuido al TGFβ varias características inmunosupresoras dentro del microambiente tumoral (TME), incluyendo la polarización M2 de los macrófagos, las iTregs y efectos directos sobre la proliferación, diferenciación y función de las células T efectoras y sin tratamiento previo. La expresión de un TGFβ de tipo II truncado (TGFβRII) que carece del dominio de cinasa actúa como un receptor de tipo II de TGFβ negativo dominante (DN-TGFβR) que inhibe la señalización de TGFβ en las células. La expresión de DN-TGFβR en células T

humanas con un CAR, mediante el uso de un vector lentiviral, mejoró los efectos anti-tumorales *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata. Dada la alta expresión de TGF β dentro del GBM, y con el fin de mitigar la actividad supresora mediada por TGF- β , se combinó un receptor II de TGF- β negativo dominante (dnTGF β RII) con una construcción bicistrónica de CART-EGFR-IL13R α 2, para generar CART-EGFR-IL13R α 2-dnTGF β RII, una construcción tri-modular. Sin que se desee que sea limitado por la teoría, se planteó la hipótesis de que este procedimiento subvertiría de forma más efectiva los mecanismos de resistencia observados en el GBM. Los datos descritos en la presente demuestran que CART-EGFR-IL13R α 2-dnTGF β RII aumenta significativamente la proliferación de células T y mejora las respuestas funcionales, en particular en ambientes tumorales ricos en TGF β . Además, estudios *in vivo* validaron la seguridad y eficacia de la cooperación del dnTGF β RII con los CARs para dirigirse y erradicar el GBM en un modelo de ratón NSG.

Dado que es necesario superar los cambios adaptativos en el microambiente tumoral local y abordar la heterogeneidad antigénica para mejorar la eficacia clínica de las estrategias dirigidas por las células T CAR, la presente descripción demuestra que las construcciones de células T CAR bicistrónicas cooperan eficientemente con los receptores II de TGF β truncado. Existen múltiples beneficios al usar el TGF β RII negativo dominante en conjunto con las construcciones del CAR, incluyendo CART-EGFR-IL13R α 2, que incluye la supresión de la señalización inmunosupresora de TGF β y la reducción en la expresión de PD-1 por las células efectoras inmunes. En ciertas modalidades, los receptores de DN-TGF β RII intensifican la capacidad proliferativa de las células T CAR en las situaciones de estimulación antigénica crónica sin efectos secundarios significativos, y han resultado en una mayor erradicación de tumores. En ciertas modalidades, las construcciones de las células T CAR tri-modulares descritas en la presente, incluyendo TGF β RII CART-EGFR-IL13R α 2, abordan los desafíos clínicos de la heterogeneidad antigénica y el TME inmunosupresor en el GBM.

Se entenderá que los métodos descritos en esta descripción no se limitan a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos en la presente, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. Asimismo, se entenderá que la terminología usada en la presente se usa únicamente para describir modalidades particulares, y no pretende ser limitativa.

Además, los experimentos descritos en la presente, a menos que se indique de otra manera, usan técnicas biológicas e inmunológicas moleculares y celulares convencionales, que están dentro de la aptitud de la técnica. Dichas técnicas son bien conocidas por el experto en la técnica, y se explican detalladamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1987-2008), incluyendo todos los suplementos; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (cuarta edición) de M. R. Green y J. Sambrook; y Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2ª edición).

A. Definiciones

A menos que se defina de otra manera, los términos científicos y técnicos usados en la presente tienen el significado que comúnmente entienden los expertos en la técnica. En caso de
 5 ambigüedad latente, las definiciones provistas en la presente prevalecen sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Salvo que el contexto lo requiera, los términos singulares incluirán las pluralidades, y los términos plurales incluirán el singular. El uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique de otra manera. El uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo.

10 En general, la nomenclatura usada en relación con el cultivo de células y tejidos, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética, la química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descrita en la presente, es bien conocida y de uso común en la técnica. Los métodos y técnicas descritos en la presente se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que
 15 se citan y analizan a lo largo de la presente especificación, a menos que se indique de otra manera. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza habitualmente en la técnica o como se describe en la presente. Las nomenclaturas usadas en relación con la química analítica, la química orgánica de síntesis y la química medicinal y farmacéutica, así como los procedimientos y técnicas de laboratorio descritas en la
 20 presente, son bien conocidos y de uso común en la técnica. Se usan técnicas estándar para la síntesis química, el análisis químico, la preparación, formulación y administración de fármacos, y el tratamiento de pacientes.

Para que la descripción se entienda más fácilmente, a continuación se definen términos seleccionados.

25 Los artículos "un" y "una" se usan en la presente para referirse a uno o más de un objeto gramatical (es decir, por lo menos uno). Por ejemplo, "un elemento" se refiere a uno o más elementos.

El término "aproximadamente", como se usa en la presente cuando se hace referencia a un valor mensurable tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar
 30 variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, aún más preferiblemente $\pm 1\%$, y todavía más preferiblemente $\pm 0.1\%$ del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

El término "activación", como se usa en la presente, se refiere al estado de una célula T que ha sido suficientemente estimulada para inducir una proliferación celular detectable. La
 35 activación puede asociarse también con la producción inducida de citocinas y funciones efectoras

detectables. El término "células T activadas" se refiere, entre otras cosas, a las células T en proceso de división celular.

Como se usa en la presente, "aliviar" una enfermedad significa reducir la severidad de uno o más síntomas de la enfermedad.

5 El término "antígeno", como se usa en la presente, se define como una molécula que causa una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede implicar la producción de anticuerpos, la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la técnica entenderá que cualquier macromolécula, incluyendo prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede actuar como un antígeno.

10 Además, los antígenos pueden derivarse de ADN recombinante o genómico. El experto en la técnica entenderá que cualquier ADN que comprenda una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial, que codifique para una proteína que induce una respuesta inmune, codifica, por lo tanto, para un "antígeno", en el sentido de este término. Además, el experto en la técnica entenderá que un antígeno no necesita ser codificado únicamente por la secuencia de
15 nucleótidos de longitud completa de un gen. Es evidente que la presente invención incluye, pero no está limitada a, el uso de secuencias parciales de nucleótidos de más de un gen, y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en varias combinaciones para inducir la respuesta inmune deseada. Además, el experto en la técnica entenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Es evidente que un antígeno puede generarse, sintetizarse o derivarse de una muestra
20 biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero no está limitada a, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

Como se usa en la presente, el término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo en el que después será reintroducido.

Una "molécula co-estimuladora" se refiere al miembro de unión cognado en una célula
25 T que se une específicamente a un ligando co-estimulador, mediando de esta manera una respuesta co-estimuladora de la célula T tal como, pero no limitada a, la proliferación. Las moléculas co-estimuladoras incluyen, pero no están limitadas a, una molécula del MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll.

Una "señal co-estimuladora", como se usa en la presente, se refiere a una señal que,
30 en combinación con una señal primaria, tal como la ligación de TCR/CD3, lleva a la proliferación de células T y/o a la sobrerregulación o subregulación de moléculas clave.

Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal en el que éste no puede mantener la homeostasis y, si no mejora, su salud continúa deteriorándose. En contraste, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasis,
35 pero su estado de salud es menos favorable que en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno

no necesariamente causa un mayor deterioro de la salud del animal.

El término "subregulación", como se usa en la presente, se refiere a la disminución o remoción de la expresión génica de uno o más genes.

Los términos "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se usan
5 indistintamente en la presente, y se refieren a la cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, como se describe en la presente, que es efectiva para lograr un resultado biológico particular o provee un beneficio terapéutico o profiláctico. Dichos resultados pueden incluir, pero no están limitados a, una cantidad que, al administrarse a un mamífero, cause un nivel detectable de inmunosupresión o tolerancia en comparación con la respuesta inmune detectada en ausencia de la
10 composición de la invención. La respuesta inmune puede evaluarse fácilmente mediante varios métodos reconocidos en la técnica. El experto en la técnica entenderá que la cantidad de la composición administrada en la presente varía, y que puede determinarse fácilmente en función de varios factores, tales como la enfermedad o condición que se esté tratando, la edad, la salud y el estado físico del mamífero tratado, la severidad de la enfermedad, el compuesto particular que se esté
15 administrando, y similares.

El término "codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, de servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos, y las
20 propiedades biológicas resultantes. De esta manera, un gen codifica para una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificadora, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia del ARNm y que suele proveerse en los listados de secuencias, como la cadena no codificadora, usada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, pueden ser consideradas
25 como codificadoras de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

Como se usa en la presente, "endógeno" se refiere a cualquier material procedente o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "epítope", como se usa en la presente, se define como una pequeña molécula química en un antígeno que puede inducir una respuesta inmune, induciendo respuestas de
30 células B y/o T. Un antígeno puede tener uno o más epítopes. La mayoría de los antígenos tienen muchos epítopes; es decir, son multivalentes. En general, un epítope tiene un tamaño aproximado de 10 aminoácidos y/o azúcares. De preferencia, el epítope tiene aproximadamente de 4 a 18 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 5 a 16 aminoácidos, y aún más preferiblemente 6 a 14 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, y muy
35 preferiblemente aproximadamente 8 a 10 aminoácidos. El experto en la técnica entiende que, en

general, la estructura tridimensional general, en lugar de la secuencia lineal específica de la molécula, es el criterio principal de especificidad antigénica y, por lo tanto, distingue un epítope de otro. Con base en la presente descripción, un péptido usado en la presente invención puede ser un epítope.

5 Como se usa en la presente, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "expandir", como se usa en la presente, se refiere a un aumento en número, como en el caso de un aumento en el número de células T. En una modalidad, las células T expandidas *ex vivo* aumentan en número con respecto al número presente originalmente en el cultivo. En otra modalidad, las células T expandidas *ex vivo* aumentan en número con respecto a otros tipos de células del cultivo. El término "*ex vivo*", como se usa en la presente, se refiere a células extraídas de un organismo vivo (por ejemplo, un humano) y propagadas fuera del organismo (por ejemplo, en una placa de cultivo, un tubo de prueba o un biorreactor).

El término "expresión", como se usa en la presente, se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida por su promotor.

15 "Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante con secuencias de control de la expresión enlazadas operablemente a una secuencia de nucleótidos que será expresada. Un vector de expresión contiene suficientes elementos cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser aportados por la célula hospedera o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, virus Sendai, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

El término "identidad", como se usa en la presente, se refiere a la identidad de la secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, en particular entre dos moléculas de aminoácidos, tal como, por ejemplo, entre dos moléculas de polipéptidos. Cuando dos secuencias de aminoácidos tienen los mismos residuos en las mismas posiciones, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de polipéptidos es ocupada por una arginina, entonces son idénticas en esa posición. La identidad o el grado en que dos secuencias de aminoácidos tienen los mismos residuos en las mismas posiciones en una alineación se expresa con frecuencia como un porcentaje. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos es una función directa del número de posiciones coincidentes (de apareamiento) o idénticas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez aminoácidos de longitud) de las posiciones en dos secuencias son idénticas, las dos secuencias son idénticas en un 50%; si el 90% de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10) son coincidentes o idénticas, las dos secuencias de aminoácidos son idénticas en un 90%.

35 El término "respuesta inmune", como se usa en la presente, se define como una

respuesta celular a un antígeno que ocurre cuando los linfocitos identifican moléculas antigénicas como extrañas e inducen la formación de anticuerpos y/o activan a los linfocitos para remover el antígeno.

El término "inmunosupresión" se usa en la presente para referirse a la reducción de la respuesta inmune general.

5 "Aislado" significa alterado o eliminado de su estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero sí lo está el mismo ácido nucleico o péptido, parcial o totalmente separado de los materiales coexistentes en su estado natural. Una proteína o ácido nucleico aislado puede existir en forma sustancialmente purificada o en un ambiente no nativo, tal como, por ejemplo, una célula hospedera.

10 El término "lentivirus", como se usa en la presente, se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus por su capacidad para infectar a células que no se dividen; pueden transferir una cantidad significativa de información genética al ADN de la célula hospedera, por lo que constituyen uno de los métodos más eficientes como vector de suministro de genes. El VIH, el SIV y el FIV son ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de lentivirus ofrecen
15 los medios para lograr niveles significativos de transferencia de genes *in vivo*.

El término "modificado", como se usa en la presente, se refiere a un cambio en el estado o la estructura de una molécula o célula de la invención. Las moléculas pueden ser modificadas de varias maneras, incluyendo químicamente, estructuralmente y funcionalmente. Las células pueden ser modificadas mediante la introducción de ácidos nucleicos.

20 El término "modulación", como se usa en la presente, se refiere a la mediación de un aumento o disminución detectable del nivel de respuesta en un sujeto, en comparación con el nivel de respuesta en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de respuesta en un sujeto de otra manera idéntico pero sin tratamiento. El término abarca la perturbación y/o alteración de una señal o respuesta nativa, mediando de esta manera una respuesta terapéutica
25 benéfica en un sujeto, de preferencia un humano.

En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos comunes: "A" se refiere a adenosina, "C" a citosina, "G" a guanosina, "T" a timidina y "U" a uridina.

El término "oligonucleótido" se refiere típicamente a polinucleótidos cortos. Se
30 entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos es representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, C, G), incluye también una secuencia de ARN (es decir, A, U, C, G) en la que "U" reemplaza a "T".

A menos que se especifique de otra manera, una "secuencia de nucleótidos que
35 codifica para una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican para la misma secuencia de aminoácidos. La frase

secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína o un ARN puede incluir también intrones, en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pueda, en algunas versiones, contener uno o más intrones.

La administración "parenteral" de una composición inmunógena incluye, por ejemplo, la inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), intracerebroventricular, intracraneal o intraesternal, o técnicas de infusión. En ciertas modalidades, las composiciones inmunógenas descritas en la presente pueden administrarse al SNC mediante la administración intracerebroventricular (por ejemplo, con un catéter de Ommaya).

El término "polinucleótido", como se usa en la presente, se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. De esta manera, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos, como se usan en la presente, son intercambiables. El experto en la técnica sabe que los ácidos nucleicos son polinucleótidos que pueden ser hidrolizados en "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos pueden ser hidrolizados en nucleósidos. Como se usa en la presente, los polinucleótidos incluyen, pero no están limitados a, todas las secuencias de ácidos nucleicos obtenidas por cualquier medio disponible en la técnica incluyendo, pero no limitado a, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácidos nucleicos de una colección recombinante o de un genoma celular, usando tecnología de clonación convencional y PCR, y similares, y mediante métodos de síntesis.

Como se usa en la presente, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente, y se refieren a un compuesto formado por residuos de aminoácidos enlazados covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o un péptido debe contener por lo menos dos aminoácidos, y no existe limitación alguna en cuanto al número máximo de aminoácidos que puede comprender la secuencia de una proteína o un péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Como se usa en la presente, el término se refiere a cadenas cortas, referidas también comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, y a cadenas más largas, referidas generalmente en la técnica como proteínas, de las cuales existen numerosos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos y proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos, o una combinación de los mismos.

El término "se une específicamente", como se usa en la presente con respecto a un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo que reconoce a un antígeno específico, pero que no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie puede unirse también a ese antígeno de una o más

especies. Sin embargo, esta reactividad entre especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno puede unirse también a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, esta reactividad cruzada no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, los términos

5 "unión específica" o "que se une específicamente" pueden usarse en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, indicando que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o un epítope) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítope "A", la

10 presencia de una molécula que contenga el epítope A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contenga "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo de TCR/CD3) con su ligando cognado, mediando de esta manera un evento de transducción de señales tal como, pero no limitado a, la transducción de

15 señales a través del complejo de TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, tal como la subregulación del TGF-beta, y/o la reorganización de estructuras del citoesqueleto, entre otras.

Una "molécula estimuladora", como el término se usa en la presente, significa una molécula en una célula T que se une específicamente con un ligando estimulador cognado presente

20 en una célula que presenta antígenos.

Un "ligando estimulador", como se usa en la presente, se refiere a un ligando que, cuando está presente en una célula que presenta antígenos (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, una célula B, etc.), puede unirse específicamente a un miembro de unión cognado (referida en la presente como "molécula estimuladora") en una célula T, mediando de esta manera una

25 respuesta primaria de la célula T incluyendo, pero no limitada a, la activación, el inicio de una respuesta inmune, la proliferación, etc. Los ligandos estimuladores son bien conocidos en la técnica, y abarcan, pero no están limitados a, una molécula del MHC de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo superagonista anti-CD28 y un anticuerpo superagonista anti-CD2.

El término "sujeto" incluye organismos vivos en los que puede inducirse una respuesta

30 inmune (por ejemplo, mamíferos). Un "sujeto" o "paciente", como se usa en este contexto, puede ser un mamífero humano o no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ganado y mascotas, tales como mamíferos ovinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y murinos. De preferencia, el sujeto es humano.

Un "sitio objetivo" o "secuencia objetivo" se refiere a una secuencia de ácido nucleico

35 que define una porción de un ácido nucleico a la que una molécula de unión puede unirse

específicamente bajo condiciones suficientes para que se produzca la unión. En algunas modalidades, una secuencia objetivo se refiere a una secuencia genómica de ácido nucleico que define una porción de un ácido nucleico a la que una molécula de unión puede unirse específicamente bajo condiciones suficientes para que se produzca la unión.

5 Como se usa en la presente, el término "receptor de células T" o "TCR" se refiere a un complejo de proteínas de membrana que participan en la activación de las células T en respuesta a la presentación de antígenos. El TCR es responsable de reconocer a los antígenos unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. El TCR está compuesto por un heterodímero de una cadena alfa (α) y beta (β), aunque en algunas células el TCR consta de cadenas gamma y delta
10 (γ/δ). Los TCRs pueden existir en las formas alfa/beta y gamma/delta, que son estructuralmente similares, pero tienen ubicaciones y funciones anatómicas distintas. Cada cadena se compone de dos dominios extracelulares: uno variable y otro constante. En algunas modalidades, el TCR puede ser modificado en cualquier célula que contenga un TCR incluyendo, por ejemplo, una célula T auxiliar, una célula T citotóxica, una célula T de memoria, una célula T reguladora, una célula T asesina natural
15 y una célula T gamma delta.

El término "terapéutico", como se usa en la presente, se refiere a un tratamiento y/o profilaxis. Un efecto terapéutico se obtiene mediante la supresión, remisión o erradicación de una enfermedad.

El término "trasplante" se refiere a una red biocompatible, o a un tejido, órgano o
20 célula de un donador, que será trasplantado. Un ejemplo de trasplante puede incluir, pero no está limitado a, células o tejido de la piel, médula ósea, y órganos sólidos tales como el corazón, el páncreas, el riñón, el pulmón y el hígado. Un trasplante puede referirse también a cualquier material que será administrado a un hospedero. Por ejemplo, un trasplante puede referirse a un ácido nucleico o a una proteína.

25 El término "transfectado", "transformado" o "transducido", como se usa en la presente, se refiere a un procedimiento por el cual se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno en una célula hospedera. Una célula "transfectada", "transformada" o "transducida" es aquella que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula primaria y su progenie.

30 "Tratar" una enfermedad, como se usa el término en la presente, significa reducir la frecuencia o severidad de por lo menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para suministrar dicho ácido al interior de una célula. Se conocen numerosos
35 vectores en la técnica que incluyen, pero no están limitados a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos

asociados a compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. De esta manera, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. Debe interpretarse también que el término incluye compuestos no plásmidos ni virales que facilitan la transferencia de un ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas, y similares. Ejemplos de
 5 vectores virales incluyen, pero no están limitados a, vectores virales de Sendai, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, y similares.

Rangos: A lo largo de esta descripción, varios aspectos de la invención pueden presentarse en formato de rango. Cabe destacar que la descripción en formato de rango se presenta únicamente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible del
 10 alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un rango describe específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de dicho rango. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un rango, tal como del 1 al 6, describe específicamente subrangos tales como del 1 al 3, del 1 al 4, del 1 al 5, del 2 al 4, del 2 al 6, del 3 al 6, etc., así como los números individuales dentro de dicho rango, por ejemplo, 1, 2, 2.7, 3, 4,
 15 5, 5.3 y 6. Esto aplica independientemente de la amplitud del rango.

B. Receptores de antígenos quiméricos

La presente invención provee receptores de antígenos quiméricos (CARs) capaces de unirse a IL13R α 2 y/o al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del
 20 mismo. Los CARs de la invención se usan en conjunción con un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII). En ciertas modalidades, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a IL13R α 2, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular. En ciertas modalidades, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular. Se proveen también
 25 composiciones y métodos para células inmunes modificadas o precursores de las mismas, por ejemplo, células T modificadas, que comprenden el CAR. De esta manera, en algunas modalidades, la célula inmune ha sido genéticamente modificada para expresar el CAR. Se proveen también ácidos nucleicos que codifican para dichos CARs, vectores que codifican para dichos ácidos nucleicos, y células modificadas (por ejemplo, células T modificadas) que comprenden dichos CARs, vectores o ácidos
 30 nucleicos.

Un CAR objeto de la invención comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a IL13R α 2 y/o al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un dominio de transmembrana y un dominio intracelular. Un CAR de la invención puede comprender opcionalmente un dominio de gozne. Por consiguiente, un CAR de la invención comprende un dominio de unión a
 35 antígeno capaz de unirse a IL13R α 2 y/o al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un

dominio de gozne, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular.

El dominio de unión a antígeno puede estar enlazado operablemente a otro dominio del CAR, tal como el dominio de transmembrana o el dominio intracelular, ambos descritos en otra parte en la presente, para su expresión en la célula. En una modalidad, una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio de unión a antígeno es enlazada operablemente a una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para un dominio de transmembrana y, además, enlazada operablemente a una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para un dominio intracelular.

Los dominios de unión a antígeno descritos en la presente pueden combinarse con cualquiera de los dominios de transmembrana, intracelulares o citoplásmicos descritos en la presente, o con cualquiera de los otros dominios descritos en la presente que puedan incluirse en un CAR de la presente invención. Un CAR de la presente invención puede incluir también un dominio de gozne como se describe en la presente. Un CAR de la presente invención puede incluir también un dominio espaciador como se describe en la presente. En algunas modalidades, cada dominio de unión a antígeno, de transmembrana e intracelular, es separado por un enlazador.

En ciertas modalidades, el CAR es capaz de unirse a IL13Ra2 de humano. En ciertas modalidades, el CAR es capaz de unirse a IL13Ra2 de canino. En ciertas modalidades, el CAR es capaz de unirse a IL13Ra2 de canino y a IL13Ra2 de humano.

En una modalidad, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a IL13Ra2 de humano, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4); y/o una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7).

En otra modalidad, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a IL13Ra2, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SRNGMS (SEQ ID NO: 12), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos TVSSGGSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 13), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos

QGTALATRFDDV (SEQ ID NO: 15); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos KASQDVGTAVA (SEQ ID NO: 16), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SASYRST (SEQ ID NO: 17), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QHHYSAPWT (SEQ ID NO: 18).

Variaciones tolerables de las secuencias del CAR serán conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos un 80%, por lo menos un 81%, por lo menos un 82%, por lo menos un 83%, por lo menos un 84%, por lo menos un 85%, por lo menos un 86%, por lo menos un 87%, por lo menos un 88%, por lo menos un 89%, por lo menos un 90%, por lo menos un 91%, por lo menos un 92%, por lo menos un 93%, por lo menos un 94%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98% o por lo menos un 99% de identidad de secuencia, con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18.

En ciertas modalidades, el CAR capaz de unirse a IL13Ra2 comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9.

En ciertas modalidades, el CAR capaz de unirse a IL13Ra2 comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 19; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 20.

En ciertas modalidades, el CAR capaz de unirse a IL13Ra2 comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno comprende un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10, 11, 21 o 22.

En ciertas modalidades, el CAR capaz de unirse a IL13Ra2 comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 75.

En ciertas modalidades, el CAR es capaz de unirse a una célula madre de GBM.

En otra modalidad, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNPSLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGFPYW (SEQ ID NO: 27); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30).

En otra modalidad, el CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo comprende un dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

En otra modalidad, el CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo comprende un dominio de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o 71.

En otra modalidad, el CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 35 o 75.

25 Dominio de unión a antígeno

El dominio de unión a antígeno de un CAR es una región extracelular del CAR que se une a un antígeno objetivo específico, incluyendo proteínas, carbohidratos y glucolípidos. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno es capaz de unirse a IL13Rα2. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno es capaz de unirse a IL13Rα2 de humano. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno es capaz de unirse a IL13Rα2 de canino. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno es capaz de unirse a IL13Rα2 de humano y de canino. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno es capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno es capaz de unirse a una isoforma de EGFR seleccionada del grupo que consiste en EGFR de tipo silvestre (wtEGFR), EGFR mutado, EGFR^{A289V}, EGFR^{A289D}, EGFR^{A289T}, EGFR^{A289T}, EGFR^{R108K}, EGFR^{R108G}, EGFR^{G598V}, EGFR^{D126Y}, EGFR^{C628F}, EGFR^{R108K/A289V},

EGFR^{R108K/D126Y}, EGFR^{A289V/G598V}, EGFR^{A289V/C628F} y variante II del EGFR, o cualquier combinación de los mismos.

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un

Fab, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), o un anticuerpo de un sólo dominio. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende un scFv capaz de unirse a IL13Ra2. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un Fab, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), o un anticuerpo de un sólo dominio. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende un scFv capaz de unirse a IL13Ra2.

Variaciones tolerables de las secuencias del dominio de unión a antígeno serán conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos un 80%, por lo menos un 81%, por lo menos un 82%, por lo menos un 83%, por lo menos un 84%, por lo menos un 85%, por lo menos un 86%, por lo menos un 87%, por lo menos un 88%, por lo menos un 89%, por lo menos un 90%, por lo menos un 91%, por lo menos un 92%, por lo menos un 93%, por lo menos un 94%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98% o por lo menos un 99% de identidad de secuencia, con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11.

Variaciones tolerables de las secuencias del dominio de unión a antígeno serán conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos un 80%, por lo menos un 81%, por lo menos un 82%, por lo menos un 83%, por lo menos un 84%, por lo menos un 85%, por lo menos un 86%, por lo menos un 87%, por lo menos un 88%, por lo menos un 89%, por lo menos un 90%, por lo menos un 91%, por lo menos un 92%, por lo menos un 93%, por lo menos un 94%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98% o por lo menos un 99% de identidad de secuencia, con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22.

El dominio de unión a antígeno puede incluir cualquier dominio que se una al antígeno, y puede incluir, pero no está limitado a, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo sintético, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo no humano, y cualquier fragmento de los mismos. En algunas modalidades, la porción del dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo de mamífero o un fragmento del mismo. La elección del dominio de unión a antígeno puede depender del tipo y número de antígenos presentes en la superficie de la

célula objetivo.

En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno (Fab), y un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). En algunas modalidades, un dominio de unión a IL13Ra2 de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo específico de IL13Ra2, un Fab específico de IL13Ra2, y un scFv específico de IL13Ra2. En una modalidad, un dominio de unión a IL13Ra2 es un anticuerpo específico de IL13Ra2. En una modalidad, un dominio de unión a IL13Ra2 es un Fab específico de IL13Ra2. En una modalidad, un dominio de unión a IL13Ra2 es un scFv específico de IL13Ra2.

Como se usa en la presente, el término "fragmento variable de cadena sencilla" o "scFv" se refiere a una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de una inmunoglobulina (por ejemplo, de ratón o humana) enlazadas covalentemente para formar un heterodímero de VH:VL. Las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) se unen directamente o mediante un enlazador que codifica para un péptido, que conecta el extremo N-terminal de la VH con el extremo C-terminal de la VL, o el extremo C-terminal de la VH con el extremo N-terminal de la VL. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno (por ejemplo, el dominio de unión a IL13Ra2) comprende un scFv que tiene la configuración de VH – enlazador – VL N-terminal a C-terminal. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende un scFv que tiene la configuración de VL – enlazador – VH N-terminal a C-terminal. Los expertos en la técnica podrán seleccionar la configuración apropiada para su uso en la presente invención.

El enlazador suele ser rico en glicina para mayor flexibilidad, así como en serina o treonina para mayor solubilidad. El enlazador puede enlazar la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del dominio extracelular de unión a antígeno. Se describen ejemplos no limitativos de enlazadores en Shen *et al.*, Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) y en el documento WO 2014/087010, cuyo contenido se incorpora de esta manera en su totalidad en la presente como referencia. Se conocen varias secuencias de enlazador en la técnica incluyendo, sin limitación, enlazadores de glicina serina (GS) tales como (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 86), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 87) y (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 88), en donde n representa un número entero de por lo menos 1. Ejemplos de secuencias de enlazador pueden comprender secuencias de aminoácidos que incluyen, sin limitación, GGSG (SEQ ID NO: 89), GSGGG (SEQ ID NO: 90), GSGSG (SEQ ID NO: 91), GSGGG (SEQ ID NO: 92), GGGSG (SEQ ID NO: 93), GSSSG (SEQ ID NO: 94), GGGGS (SEQ ID NO: 95), GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 68), y similares. Los expertos en la técnica podrán seleccionar la secuencia de enlazador apropiada para su uso en la presente invención. En una modalidad, un dominio de unión a antígeno de la presente invención comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VH y la VL son separadas por la secuencia de

enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 68), que puede ser codificada por la secuencia de ácido nucleico GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCT (SEQ ID NO: 96).

A pesar de la remoción de las regiones constantes y la introducción de un enlazador, las proteínas del scFv conservan la especificidad de la inmunoglobulina original. Los anticuerpos de polipéptidos de Fv de cadena sencilla pueden expresarse a partir de un ácido nucleico que comprenda secuencias que codifiquen para VH y VL, como se describe en Huston *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988). Véase también las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,091,513, 5,132,405 y 4,956,778, y la publicación de patente de los Estados Unidos No. 20050196754. Se han descrito scFvs antagonistas que tienen actividad inhibidora (véase, por ejemplo, Zhao *et al.*, Hyrbidoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter *et al.*, J Cachexia Sarcopenia Muscle, 12 de Agosto de 2012; Shieh *et al.*, J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli *et al.*, Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife *et al.*, J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks *et al.*, Immunotechnology 1997 3(3):173-84; y Moosmayer *et al.*, Ther Immunol 1995 2(10):31-40). Se han descrito scFvs agonistas que tienen actividad estimuladora (véase, por ejemplo, Peter *et al.*, J Biol Chem 2003 278(38):36740-7; Xie *et al.*, Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter *et al.*, Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55; y Ho *et al.*, Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66).

Como se usa en la presente, "Fab" se refiere a un fragmento de una estructura de anticuerpo que se une a un antígeno, pero que es monovalente y no tiene una porción Fc, por ejemplo, un anticuerpo digerido por la enzima papaína produce dos fragmentos Fab y un fragmento Fc (por ejemplo, una región constante de cadena pesada (H); región Fc que no se une a un antígeno).

Como se usa en la presente, "F(ab')₂" se refiere a un fragmento de anticuerpo generado mediante la digestión con pepsina de anticuerpos de IgG completos, en donde este fragmento tiene dos regiones de unión a antígeno (ab') (bivalentes), en donde cada región (ab') comprende dos cadenas de aminoácidos independientes, una parte de una cadena H y una cadena ligera (L) enlazadas por un enlace de S—S para la unión a un antígeno, y en donde las porciones restantes de la cadena H están enlazadas entre sí. Un fragmento "F(ab')₂" puede dividirse en dos fragmentos Fab' individuales.

En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno puede derivar de la misma especie en la que se usará finalmente el CAR. Por ejemplo, para su uso en humanos, el dominio de unión a antígeno del CAR puede comprender un anticuerpo humano o un fragmento del mismo. En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno puede derivar de una especie diferente en la que se usará finalmente el CAR. Por ejemplo, para su uso en humanos, el dominio de unión a antígeno del CAR puede comprender un anticuerpo de murino o un fragmento del mismo.

En algunas modalidades, un CAR de la presente descripción puede tener afinidad por

uno o más antígenos objetivo en una o más células objetivo. En algunas modalidades, un CAR puede tener afinidad por uno o más antígenos objetivo en una célula objetivo. En dichas modalidades, el CAR es un CAR biespecífico o un CAR multiespecífico. En algunas modalidades, el CAR comprende uno o más dominios de unión específicos del objetivo que confieren afinidad por uno o más antígenos objetivo. En algunas modalidades, el CAR comprende uno o más dominios de unión específicos del objetivo que confieren afinidad por el mismo antígeno objetivo. Por ejemplo, un CAR que comprenda uno o más dominios de unión específicos del objetivo con afinidad por el mismo antígeno objetivo podría unirse a distintos epítopes del antígeno objetivo. Cuando un CAR contiene una pluralidad de dominios de unión específicos del objetivo, estos pueden estar dispuestos en tándem y separados por péptidos enlazadores. Por ejemplo, en un CAR que comprenda dos dominios de unión específicos del objetivo, los dominios de unión están conectados entre sí de forma covalente en una sola cadena de polipéptidos, a través de un enlazador de oligo- o poli-péptidos, una región de gozne de Fc, o una región de gozne de membrana.

15 Dominio de transmembrana

Los CARs de la presente invención pueden comprender un dominio de transmembrana que conecta el dominio de unión a antígeno del CAR con su dominio intracelular. El dominio de transmembrana de un CAR en cuestión es una región capaz de abarcar la membrana plasmática de una célula (por ejemplo, una célula inmune o precursor de la misma). El dominio de transmembrana se inserta en una membrana celular, por ejemplo, la membrana de una célula eucariótica. En algunas modalidades, el dominio de transmembrana se interpone entre el dominio de unión a antígeno y el dominio intracelular de un CAR.

En algunas modalidades, el dominio de transmembrana se asocia de forma natural con uno o más dominios del CAR. En algunas modalidades, el dominio de transmembrana puede ser seleccionado o modificado por una o más sustituciones de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios de transmembrana de la misma o de diferentes proteínas de superficie de la membrana, para reducir al mínimo las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

El dominio de transmembrana puede derivar de una fuente natural o sintética. Si la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína de transmembrana o unida a la membrana, por ejemplo, una proteína de transmembrana de tipo I. Si la fuente es sintética, el dominio de transmembrana puede ser cualquier secuencia artificial que facilite la inserción del CAR en la membrana celular, por ejemplo, una secuencia hidrofóbica artificial. Ejemplos del dominio de transmembrana de uso particular en esta invención incluyen, sin limitación, los dominios de transmembrana derivados de (es decir, que comprenden por lo menos la(s) región(es) de transmembrana(s) de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45,

CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), receptor tipo Toll 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, o un dominio de transmembrana derivado de un receptor tipo inmunoglobulina asesina (KIR). En una modalidad, el dominio de transmembrana comprende un dominio de transmembrana de CD8. En una

5 modalidad, el dominio de transmembrana de CD8 es un dominio de transmembrana de CD8 alfa.

En algunas modalidades, el dominio de transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso estará compuesto principalmente de residuos hidrofóbicos, tales como leucina y valina. De preferencia, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio de transmembrana sintético.

10 Los dominios de transmembrana descritos en la presente pueden combinarse con cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en la presente, cualquiera de los dominios intracelulares descritos en la presente, o cualquiera de los otros dominios descritos en la presente que puedan incluirse en un CAR de la invención.

En algunas modalidades, el dominio de transmembrana comprende además una

15 región de gozne. Un CAR de la presente invención puede incluir también una región de gozne. La región de gozne del CAR es una región hidrofílica ubicada entre el dominio de unión a antígeno y el dominio de transmembrana. En algunas modalidades, este dominio facilita el plegamiento adecuado de las proteínas del CAR. La región de gozne es un componente opcional del CAR. La región de gozne puede incluir un dominio seleccionado de fragmentos Fc de anticuerpos, regiones de gozne de

20 anticuerpos, regiones CH2 de anticuerpos, regiones CH3 de anticuerpos, secuencias de gozne artificiales, o combinaciones de los mismos. Ejemplos de regiones de gozne incluyen, pero no están limitados a, un gozne de CD8a, goznes artificiales compuestos por polipéptidos que pueden ser tan pequeños como tres glicinas (Gly), así como los dominios CH1 y CH3 de las moléculas de IgG (tal como la IgG4 humana).

25 En algunas modalidades, un CAR objeto de la presente descripción incluye una región de gozne que conecta el dominio de unión a antígeno con el dominio de transmembrana, el cual, a su vez, se conecta al dominio intracelular. De preferencia, la región de gozne permite que el dominio de unión a antígeno reconozca y se una al antígeno objetivo en las células objetivo (véase, por ejemplo, Hudecek *et al.*, Cancer Immunol. Res. (2015) 3(2): 125-135). En algunas modalidades, la región de

30 gozne es un dominio flexible, lo que permite que el dominio de unión a antígeno tenga una estructura que le permita reconocer óptimamente la estructura y densidad específicas de los antígenos objetivo en una célula, tal como una célula tumoral (véase Hudecek *et al.*, citado anteriormente). La flexibilidad de la región de gozne le permite adoptar muchas conformaciones diferentes.

En algunas modalidades, la región de gozne es una región de gozne de la cadena

35 pesada de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la región de gozne es un polipéptido de la región

de gozne derivado de un receptor (por ejemplo, una región de gozne derivada de CD8).

La región de gozne puede tener una longitud de entre aproximadamente 4 y 50 aminoácidos, por ejemplo, de entre aproximadamente 4 aa y aproximadamente 10 aa, de entre aproximadamente 10 aa y aproximadamente 15 aa, de entre aproximadamente 15 aa y aproximadamente 20 aa, de entre aproximadamente 20 aa y aproximadamente 25 aa, de entre aproximadamente 25 aa y aproximadamente 30 aa, de entre aproximadamente 30 aa y aproximadamente 40 aa, o de entre aproximadamente 40 aa y aproximadamente 50 aa. En algunas modalidades, la región de gozne puede tener una longitud mayor de 5 aa, mayor de 10 aa, mayor de 15 aa, mayor de 20 aa, mayor de 25 aa, mayor de 30 aa, mayor de 35 aa, mayor de 40 aa, mayor de 45 aa, mayor de 50 aa, mayor de 55 aa, o más.

Pueden seleccionarse fácilmente regiones de gozne adecuadas, y pueden tener cualquier longitud adecuada, tal como de 1 aminoácido (por ejemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 a 15 aminoácidos, de 3 a 12 aminoácidos, incluyendo de 4 a 10 aminoácidos, de 5 a 9 aminoácidos, de 6 a 8 aminoácidos o de 7 a 8 aminoácidos, y pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos. Las regiones de gozne adecuadas pueden tener una longitud de más de 20 aminoácidos (por ejemplo, 30, 40, 50, 60 o más aminoácidos).

Por ejemplo, las regiones de gozne incluyen polímeros de glicina (G_n), polímeros de glicina-serina (incluyendo, por ejemplo, $(GS)_n$, $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 86) y $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 87), en donde n es un entero de por lo menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Pueden usarse polímeros de glicina y de glicina-serina; tanto la Gly como la Ser son relativamente desestructuradas y, por lo tanto, pueden servir como un anclaje neutro entre los componentes. Pueden usarse polímeros de glicina; la glicina accede a un espacio phi-psi significativamente mayor que incluso la alanina, y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (véase, por ejemplo, Scheraga, Rev. Computational. Chem. (1992) 2: 73-142). Ejemplos de regiones de gozne pueden comprender secuencias de aminoácidos que incluyen, pero no están limitadas a, GGSG (SEQ ID NO: 89), GGS GG (SEQ ID NO: 90), GSGSG (SEQ ID NO: 91), GSGGG (SEQ ID NO: 92), GGGSG (SEQ ID NO: 93), GSSSG (SEQ ID NO: 94), y similares.

En algunas modalidades, la región de gozne es una región de gozne de la cadena pesada de inmunoglobulina. Las secuencias de aminoácidos de la región de gozne de inmunoglobulina son conocidas en la técnica; véase, por ejemplo, Tan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87(1):162-166; y Huck *et al.*, Nucleic Acids Res. (1986) 14(4): 1779-1789. Como ejemplos no limitativos, una región de gozne de inmunoglobulina puede incluir una de las siguientes secuencias de aminoácidos: DKTHT (SEQ ID NO: 97); CPPC (SEQ ID NO: 98); CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO: 99) (véase, por ejemplo, Glaser *et al.*, J. Biol. Chem. (2005) 280:41494-41503); ELKTPLGDTTHT (SEQ ID

NO: 100); KSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 101); KCCVDCP (SEQ ID NO: 102); KYGPPCP (SEQ ID NO: 103); EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 104) (gozne de IgG1 humana); ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 105) (gozne de IgG2 humana); ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO: 106) (gozne de IgG3 humana); SPNMVPHAHHAQ (SEQ ID NO: 107) (gozne de IgG4 humana); y similares.

5 La región de gozne puede comprender una secuencia de aminoácidos de una región de gozne de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En una modalidad, la región de gozne puede incluir una o más sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en comparación con una región de gozne de tipo silvestre (de ocurrencia natural). Por ejemplo, la His229 del gozne de la IgG1 humana puede ser sustituida por Tyr, de modo que la región de gozne comprende la secuencia
10 EPKSCDKTYTCPPCP (SEQ ID NO: 104); véase, por ejemplo, Yan *et al.*, J. Biol. Chem. (2012) 287: 5891-5897. En una modalidad, la región de gozne puede comprender una secuencia de aminoácidos derivada de CD8 de humano, o una variante del mismo.

Dominio intracelular

15 Un CAR objeto de la presente invención incluye también un dominio intracelular. En ciertas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización intracelular. El dominio intracelular del CAR es responsable de la activación de por lo menos una de las funciones efectoras de la célula en la que se expresa el CAR (por ejemplo, una célula inmune). El dominio intracelular transduce la señal de la función efectora, y dirige a la célula
20 (por ejemplo, una célula inmune) para que realice su función especializada, por ejemplo, dañar y/o destruir una célula objetivo.

Ejemplos de un dominio intracelular para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, la porción citoplásmica de un receptor de superficie, una molécula co-estimuladora, y cualquier molécula que actúe en conjunto para iniciar la transducción de señales en la célula T, así
25 como cualquier derivado o variante de estos elementos y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

Ejemplos del dominio intracelular incluyen, sin limitación, la cadena ζ del complejo receptor de células T o cualquiera de sus homólogos, por ejemplo, la cadena η , las cadenas de Fc γ RI y β , la cadena MB 1 (Ig α), la cadena B29 (Ig), etc., la cadena de CD3 zeta humana, los polipéptidos
30 CD3 (Δ , δ y ϵ), las tirosina cinasas de la familia syk (Syk, ZAP 70, etc.), las tirosina cinasas de la familia CRS (Lck, Fyn, Lyn, etc.), y otras moléculas implicadas en la transducción de células T, tales como CD2, CD5 y CD28. En una modalidad, el dominio de señalización intracelular puede ser la cadena de CD3 zeta humana, Fc γ RIII, Fc γ RI, las colas citoplásmicas de los receptores de Fc, un motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) que posee receptores citoplásmicos, y
35 combinaciones de los mismos.

En ciertas modalidades, el dominio intracelular del CAR incluye cualquier porción de una o más moléculas co-estimuladoras, tales como por lo menos un dominio de señalización de CD2, CD3, CD8, CD27, CD28, ICOS, 4-1BB, PD-1, cualquier derivado o variante del mismo, cualquier secuencia sintética del mismo que tenga la misma capacidad funcional, y cualquier combinación de los mismos. El dominio intracelular comprende un dominio co-estimulador de una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteínas de la superfamilia de TNFR, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS, NKG2C y B7-H3 (CD276), o una variante de las mismas, o un dominio intracelular derivado de un receptor tipo inmunoglobulina asesina (KIR). En ciertas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio co-estimulador de 4-1BB.

Otros ejemplos del dominio intracelular incluyen un fragmento o dominio de una o más moléculas o receptores que incluyen, pero no están limitados a, TCR, CD3 zeta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD86, FcR gamma común, FcR beta (Fc épsilon RIb), CD79a, CD79b, Fc gamma RIIa, DAP10, DAP12, receptor de células T (TCR), CD8, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX9, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, una proteína de la familia KIR, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, CD8, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8 alfa, CD8 beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, receptor 1 tipo Toll (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, otras moléculas co-estimuladoras descritas en la presente, cualquier derivado, variante o fragmento de los mismos, cualquier secuencia sintética de una molécula co-estimuladora que tenga la misma capacidad funcional, y cualquier combinación de los mismos.

Ejemplos adicionales de dominios intracelulares incluyen, sin limitación, dominios de señalización intracelular de varios tipos de otros receptores de señalización inmune que incluyen, pero no están limitados a, proteínas de señalización de células T de primera, segunda y tercera generación, incluyendo CD3, co-estimuladores de la familia B7 y receptores de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) (véase, por ejemplo, Park y Brentjens, J. Clin. Oncol. (2015) 33(6): 651-653). Además, los dominios de señalización intracelular pueden incluir dominios de señalización usados por las células NK y NKT (véase, por ejemplo, Hermanson y Kaufman, Front. Immunol. (2015) 6: 195), tales como los dominios de señalización de NKp30 (B7-H6) (véase, por ejemplo, Zhang *et al.*,

J. Immunol. (2012) 189(5): 2290-2299), y DAP 12 (véase, por ejemplo, Topfer *et al.*, J. Immunol. (2015) 194(7): 3201-3212), NKG2D, NKp44, NKp46, DAP10 y CD3z.

En ciertas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización intracelular seleccionado del grupo que consiste en dominios de señalización citoplásmica de una
 5 cadena de CD3 zeta humana (CD3ζ), FcγRIII, FcεRI, una cola citoplásmica de un receptor de Fc, un receptor citoplásmico inmunorreceptor que posee un motivo de activación basado en tirosina (ITAM), TCR zeta, FcR gamma, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d, o una variante de los mismos. En ciertas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio intracelular de CD3ζ.

10 Los dominios intracelulares adecuados para su uso en un CAR de la presente invención incluyen cualquier dominio de señalización deseado que provea una señal distintiva y detectable (por ejemplo, aumento de la producción de una o más citocinas por la célula; cambio en la transcripción de un gen objetivo; cambio en la actividad de una proteína; cambio en el comportamiento de las células, por ejemplo, muerte celular; proliferación celular; diferenciación celular; supervivencia celular;
 15 modulación de las respuestas de señalización celular; etc.) en respuesta a la activación del CAR (es decir, activado por un antígeno y un agente de dimerización). En algunas modalidades, el dominio intracelular incluye por lo menos un motivo ITAM (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc.), como se describe a continuación. En algunas modalidades, el dominio intracelular incluye cadenas de señalización de tipo DAP10/CD28. En algunas modalidades, el dominio intracelular no está
 20 unido covalentemente al CAR unido a la membrana, sino que se difunde en el citoplasma.

Los dominios intracelulares adecuados para su uso en un CAR de la presente invención incluyen polipéptidos de señalización intracelular que contienen un motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). En algunas modalidades, un motivo ITAM se repite dos veces en un dominio intracelular, en donde la primera y la segunda instancia del motivo ITAM están
 25 separadas entre sí por 6 a 8 aminoácidos. En una modalidad, el dominio intracelular de un CAR comprende 3 motivos ITAM.

En algunas modalidades, los dominios intracelulares incluyen los dominios de señalización de los receptores de inmunoglobulina humana que contienen motivos de activación basados en tirosina del inmunorreceptor (ITAMs) tales como, pero no limitados a, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcRL5 (véase, por ejemplo, Gillis *et al.*, Front.
 30 Immunol. (2014) 5:254).

Un dominio intracelular adecuado puede ser una porción con un motivo ITAM derivada de un polipéptido que contiene un motivo ITAM. Por ejemplo, un dominio intracelular adecuado puede ser un dominio con un motivo ITAM de cualquier proteína que lo contenga. De esta manera, un dominio
 35 intracelular adecuado no necesita contener la secuencia completa de la proteína de la que se deriva.

Ejemplos de polipéptidos con motivos ITAM adecuados incluyen, entre otros: DAP12, FCER1G (cadena gamma del receptor I de Fc épsilon), CD3D (CD3 delta), CD3E (CD3 épsilon), CD3G (CD3 gamma), CD3Z (CD3 zeta) y CD79A (cadena alfa de la proteína asociada al complejo receptor del antígeno).

En una modalidad, el dominio intracelular se deriva de DAP12 (conocido también como TYROBP; proteína de unión a la tirosina cinasa de la proteína TYRO; KARAP; PLOSL; proteína 12 de activación de DNAX; proteína asociada a KAR; proteína de unión a la tirosina cinasa de la proteína TYRO; proteína asociada al receptor activador de células asesinas; etc.). En una modalidad, el dominio intracelular se deriva de FCER1G (conocido también como FCRG; cadena gamma del receptor I de Fc épsilon; cadena gamma del receptor de Fc; fc-épsilon RI-gamma; fcRgamma; fceRI gamma; subunidad gamma del receptor de inmunoglobulina épsilon de alta afinidad; receptor de inmunoglobulina E, cadena gamma de alta afinidad; etc.). En una modalidad, el dominio intracelular se deriva de la cadena CD3 delta de la glucoproteína de superficie de células T (conocida también como CD3D; CD3-DELTA; T3D; antígeno CD3, subunidad delta; CD3 delta; antígeno CD3d, polipéptido delta (complejo TIT3); OKT3, cadena delta; cadena delta T3 del receptor de células T; cadena CD3 delta de la glucoproteína de superficie de células T; etc.). En una modalidad, el dominio intracelular se deriva de la cadena CD3 épsilon de la glucoproteína de superficie de células T (conocida también como CD3e, cadena épsilon del antígeno de superficie de células T T3/Leu-4, cadena CD3 épsilon de la glucoproteína de superficie de células T, AI504783, CD3, CD3épsilon, T3e, etc.). En una modalidad, el dominio intracelular se deriva de la cadena CD3 gamma de la glucoproteína de superficie de células T (conocida también como CD3G, cadena gamma T3 del receptor de células T, CD3-GAMMA, T3G, polipéptido gamma (complejo TIT3), etc.). En una modalidad, el dominio intracelular se deriva de la cadena CD3 zeta de la glucoproteína de superficie de células T (conocida también como CD3Z, cadena zeta T3 del receptor de células T, CD247, CD3-ZETA, CD3H, CD3Q, T3Z, TCRZ, etc.). En una modalidad, el dominio intracelular se deriva de CD79A (conocida también como cadena alfa de la proteína asociada al complejo receptor de antígenos de células B; antígeno CD79a (alfa asociado a inmunoglobulina); glucoproteína de membrana MB-1; ig-alfa; proteína asociada a inmunoglobulina unida a la membrana; proteína asociada a IgM de superficie; etc.). En una modalidad, un dominio intracelular adecuado para su uso en un CAR FN3 de la presente descripción incluye una cadena de señalización de tipo DAP10/CD28. En una modalidad, un dominio intracelular adecuado para su uso en un CAR FN3 de la presente descripción incluye un polipéptido ZAP70. En algunas modalidades, el dominio intracelular incluye un dominio de señalización citoplásmica de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b o CD66d. En una modalidad, el dominio intracelular del CAR incluye un dominio de señalización citoplásmica de CD3 zeta humano.

Mientras que usualmente puede usarse todo el dominio intracelular, en muchos casos no es necesario usar la cadena completa. Si se usa una porción truncada del dominio intracelular, esta

puede sustituir a la cadena intacta, siempre que transduzca la señal de la función efectora. El dominio intracelular incluye cualquier porción truncada suficiente para transducir la señal de la función efectora.

- Los dominios intracelulares descritos en la presente pueden combinarse con cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en la presente, cualquiera de los dominios de transmembrana descritos en la presente, o cualquiera de los otros dominios descritos en la presente que puedan incluirse en el CAR.
- 5

CUADRO 1**Secuencias usadas en la invención**

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos/nucleótidos
2	DN-TGFβRII	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLC KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWVRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTS NPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQQLSS
14	DN-TGFβRII	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGT GGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTTCAAGTTCGTTAAT AACGACATGATAGTCACTGACAACAACGGTGACAGTCAAGTTTCCACAACCTG TGTAATTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGC ATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTG TGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTT GCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTT CTCCAAAGTGCATTATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCA TGTGTTCTGTAGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAG AATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAG GCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCT TCTACTGCTACCGCGTTAACCGGCAGCAGAAGCTGAGTTCATAG
1	Hu07, HCDR1	TKYGVH
3	Hu07, HCDR2	GVKWAGGSTDYNALMS
4	Hu07, HCDR3	DHRDAMDY
5	Hu07, LCDR1	TASLSVSSTYLH
6	Hu07, LCDR2	STSNLAS
7	Hu07, LCDR3	HQYHRSPLT
8	Hu07, VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTQYGVHWVRQAPGKGLEWVGK WAGGSTDYNALMSRFTISKDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHRDA MDYWGQGTLLTVSS
9	Hu07, VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASLSVSSTYLHWYQQKPGSSPKLWIYST SNLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATYYCHQYHRSPLTFGGGTK VEIK
10	Hu07, (VL>VH) scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASLSVSSTYLHWYQQKPGSSPKLWIYST SNLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATYYCHQYHRSPLTFGGGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTQY GVHWVRQAPGKGLEWVGKQWAGGSTDYNALMSRFTISKDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDHRDAMDYWGQGTLLTVSS
11	Hu07, (VH>VL) scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTQYGVHWVRQAPGKGLEWVGK WAGGSTDYNALMSRFTISKDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHRDA MDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCTASLSVSSTYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTSY TLTISSLQPEDFATYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIK
23	Hu07-BBz, CAR (VH>VL)	MALPVTALLPLALLHAARPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT KYGVHWVRQAPGKGLEWVGKQWAGGSTDYNALMSRFTISKDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDHRDAMDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASLSVSSTYLHWYQQKPGSSPKLWI STSNLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATYYCHQYHRSPLTFGGGT KVEIKSGTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC

		RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
55	Hu07-BBz, CAR (VL>VH)	MALPVTALLPLALLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASLSVS STYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTISSLQPE DFATYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFSLTKEYGVHWVRQAPGKGLEWVGKAWAGGSTDY NSALMSRFTISKDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHRDAMDYWGQG TLVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
12	Hu08, HCDR1	SRNGMS
13	Hu08, HCDR2	TVSSGGSYIYYADSVKG
15	Hu08, HCDR3	QGTALATRFFDV
16	Hu08, LCDR1	KASQDVGTAVA
17	Hu08, LCDR2	SASYRST
18	Hu08, LCDR3	QHHYSAPWT
19	Hu08, VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQTPDKRLEWVAT VSSGGSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARQGT ALATRFFDVWGQGLTVTVSS
20	Hu08, VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQIPGKAPKLLIYSAS YRSTGVPDRFSGSGSGTDFSEFIISLQPEDFATYYCQHHYSAPWTFGGGTKV EIK
21	Hu08, scFv (VH>VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQTPDKRLEWVAT VSSGGSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARQGT ALATRFFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQIPGKAPKLLIYSASYRSTGVPDRFSGSGS GTDFSEFIISLQPEDFATYYCQHHYSAPWTFGGGTKVEIK
22	Hu08, scFv (VL>VH)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQIPGKAPKLLIYSAS YRSTGVPDRFSGSGSGTDFSEFIISLQPEDFATYYCQHHYSAPWTFGGGTKV EIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNG MSWVRQTPDKRLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMS SLRAEDTAVYYCARQGTALATRFFDVWGQGLTVTVSS
24	Hu08, CAR (VH>VL)	MALPVTALLPLALLHAARPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS RNGMSWVRQTPDKRLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYL QMSSLRAEDTAVYYCARQGTALATRFFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQIPGKAPK LLIYSASYRSTGVPDRFSGSGSGTDFSEFIISLQPEDFATYYCQHHYSAPWTF GGGKVEIKSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
25	806, HCDR1	GYSITSDFAWN
26	806, HCDR2	GYISYSGNTRYNP SLK
27	806, HCDR3	VTAGRGFPYW
28	806, LCDR1	HSSQDINSNIG
29	806, LCDR2	HGTNLDD
30	806, LCDR3	VQYAQFPWT

31	806, VH	DVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIWIRQFPGNKLEWMGY ISYSGNTRYNP SLKSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFP YWGQGLTVTVSA
73	806, VH	GACGTACAAC TGAAGAATCCGGGCCGAGTTTGGTCAAGCCCTCTCAATC TCTTTCTCTCACTTGACGGTCACCGGATACTCCATAACCAGCGATTTTGC GTGGAATTGGATTCGACAATTTCCAGGGAATAAATTGGAATGGATGGGAT ATATCAGTTATTCTGGTAATACCAGATACAACCCGTCATTGAAAAGTCGCA TCTCTATAACACGAGACACTTCAAAGAATCAGTTCTTCCTTCAGCTCAATT CTGTAACCATCGAAGATACTGCTACTTATTACTGTGTAACGGCGGGTTCGA GGATTCCCCTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTTACTGTTTCCGCC
32	806, VL	DILMTQSPSSMSVSLGDTV SITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFGLIYHGT NLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPWTFGGGTKL EIKR
74	806, VL	GATATTCTGATGACTCAATCTCCGTCTTCTATGAGCGTGAGCTTGGGTGA CACCGTCAGCATCACCTGTCATTCCAGCCAGGATATAAACTCAAATATCGG CTGGCTCCAGCAACGCCAGGCAAGTCATTCAAGGGGGCTTATTTATCATG GCACCAATCTTGACGATGAAGTCCCATCACGCTTCAGCGGATCAGGCTCA GGTGCGGACTATTCTTGACTATAAGTTCCTCGAATCTGAGGATTTTCGC CGACTATTATTGCGTACAATACGCCAGTTTCCCTGGACCTTCGGAGGCG GCACCAAATTGGAGATAAAAAGG
70	806, scFv (VL>VH)	GATATTCTGATGACTCAATCTCCGTCTTCTATGAGCGTGAGCTTGGGTGA CACCGTCAGCATCACCTGTCATTCCAGCCAGGATATAAACTCAAATATCGG CTGGCTCCAGCAACGCCAGGCAAGTCATTCAAGGGGGCTTATTTATCATG GCACCAATCTTGACGATGAAGTCCCATCACGCTTCAGCGGATCAGGCTCA GGTGCGGACTATTCTTGACTATAAGTTCCTCGAATCTGAGGATTTTCGC CGACTATTATTGCGTACAATACGCCAGTTTCCCTGGACCTTCGGAGGCG GCACCAAATTGGAGATAAAAAGGGGTGGAGGAGGATCAGGCGGGGGTGG AAGCGGCGGAGGAGGCAGCGACGTACAAC TGAAGAATCCGGGCCGAGT TTGGTCAAGCCCTCTCAATCTCTTCTCTCACTTGACGGTCACCGGATAC TCCATAACCAGCGATTTTTCGTGGAATTGGATTCGACAATTTCCAGGGAA TAAATTGGAATGGATGGGATATATCAGTTATTCTGGTAATACCAGATACAA CCCGTCATTGAAAAGTCGCATCTCTATAACACGAGACACTTCAAAGAATCA GTTCTTCCTTCAGCTCAATTCTGTAACCATCGAAGATACTGCTACTTATTA CTGTGTAACGGCGGGTTCGAGGATTTCCCCTACTGGGGCCAGGGTACACTG GTTACTGTTTCCGCC
33	806, scFv (VH>VL)	DVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIWIRQFPGNKLEWMGY ISYSGNTRYNP SLKSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFP YWGQGLTVTVSAGGGGSGGGGSDILMTQSPSSMSVSLGDTV SITC HSSQDINSNIGWLQQRPGKSFGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTI SSLESEDFADYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR
71	806, scFv (VL>VH)	DILMTQSPSSMSVSLGDTV SITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFGLIYHGT NLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPWTFGGGTKL EIKRGGGGSGGGGSDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDF AWNWIWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNP SLKSRISITRDT SKNQFFLQLN SVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGLTVTVSA
34	806-BBZ-CAR (VL>VH)	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCAC GCCGCTCGGCCCCGATATTCTGATGACTCAATCTCCGTCTTCTATGAGCGT GAGCTTGGGTGACACCGTCAGCATCACCTGTCATTCCAGCCAGGATATAA ACTCAAATATCGGCTGGCTCCAGCAACGCCAGGCAAGTCATTCAAGGGG CTTATTTATCATGGCACCAATCTTGACGATGAAGTCCCATCACGCTTCAGC GGATCAGGCTCAGGTGCGGACTATTCTTGACTATAAGTTCCTCGAATC TGAGGATTTTCGCCGACTATTATTGCGTACAATACGCCAGTTTCCCTGGAC CTTCGGAGGCGGCACCAAATTGGAGATAAAAAGGGGTGGAGGAGGATCA

		GGCGGGGGTGGGAAGCGGCGGAGGAGGCAGCGACGTACAACCTGCAAGAAT CCGGGCGGAGTTTGGTCAAGCCCTCTCAATCTCTTTCTCTCACTTGCACGG TCACCGGATACTCCATAACCAGCGATTTTGGTGGAAATTGGATTGACAAT TTCCAGGGAATAAATTGGAATGGATGGGATATATCAGTTATTCTGGTAAT ACCAGATACAACCCGTCATTGAAAAGTCGCATCTCTATAACACGAGACACT TCAAAGAATCAGTTCTTCCTTCAGCTCAATTCTGTAACCATCGAAGATACT GCTACTTATTACTGTGTAACGGCGGGTCGAGGATTCCCCTACTGGGGCCA GGGTACACTGGTTACTGTTTCCGCCACCACTACCCAGCACCAGGCGCAC CCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAG GCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTT CGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCC TGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGGAAGAAG CTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAA GAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCT GCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAG CAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGA GTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGG AAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAA GGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCA GAAGAGGCAAAGGCCACGACGGAAGTGTACCAGGGAAGTACGACCGCCACC AAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
35	806-BBZ-CAR (VL>VH)	MALPVTALLPLALLLHAARPDILMTQSPSSMSVSLGDTVITCHSSQDINSN IGWLQQRPGKSFGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGGADYSLTISSLESEDF DYCVQYQFPWTFGGGKLEIKRGGGSGGGGSDVQLQESGPSL VKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNP SLKSRISITRDTSKNQFFLQNSVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGLTV SATTTAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEE EEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
75	806-BBZ-CAR (VH>VL)	MALPVTALLPLALLLHAARPDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSD AWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNP SLKSRISITRDTSKNQFFLQNL SVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGLTVVSAGGGSGGGGSGGGGSDIL MTQSPSSMSVSLGDTVITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFGLIYHGTNL DDEVPSRFSGSGGADYSLTISSLESEDFADYCVQYQFPWTFGGGKLEI KRTTTAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEE EEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
36	Gozne de CD8	ACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCC CAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGC CGTGATACCCGGGTCTTGACTTCGCTGCGAT
37	Dominio de transmembrana de CD8	ATCTACATTTGGGCCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTC ACTCGTGATCACTCTTTACTGT
38	Dominio intracelular de 4- 1BB	AAGCGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAG GCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGTTCCCAG AGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTG
39	CD3-zeta	CGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCA GAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACG TGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCG

		CAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGA TGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGG CAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACA CCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
40	T2A	GGCAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGG AGAATCCCGGC
41	P2A	GGCTCCGGCGCTACAACTTTAGTCTGCTGAAACAGGCTGGAGATGTGGA GGAAAACCCCGGCCCT
43	Hu08, CAR (VL>VH)	MALPVTALLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVG TAVAWYQQIPGKAPKLLIYSASYRSTGVPDRFSGSGSGTDFSISSLQPEDF ATYYCQHHYSAPWTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQTPDKRLEWVATVSSGGSYIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARQGTTALATRFDFVWG QGTLTVTVSSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLQYNELNLGRREEYDVL KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
44	Hu07, VH	GAAGTACAGCTGGTTGAGAGTGGCGGGGGTCTCGTACAGCCCGGCGGGT CTCTTAGGCTCTCCTGTGCTGCTTCTGGTTTCTCCTTGACTAAATACGGGG TACATTGGGTTGCGCAGGCCCTGGCAAAGTCTTGAATGGGTGGGCGTC AAGTGGGCTGGCGGAAGCACTGATTATAATTCCGCATTGATGTCCCGATT CACTATTTCTAAGGATAATGCCAAGAACAGTCTCTATTTGCAAATGAACTC CCTGAGAGCGGAGGATACTGCCGTTTACTACTGTGCACGGGATCACCGAG ACGCTATGGATTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTGACCGTAAGCTCC
45	Hu07, HCDR1	ACTAAATACGGGGTACAT
46	Hu07, HCDR2	GGCGTCAAGTGGGCTGGCGGAAGCACTGATTATAATTCCGCATTGATGTC C
47	Hu07, HCDR3	GATCACCGAGACGCTATGGATTAC
48	Hu07, VL	GACATACAAATGACACAGTCCCCCTCATCCTTGCTGCTTCCGTAGGAGAC CGGGTTACCATCACGTGCACCGCTTCTTTGTCCGTTTCAAGTACCTACCTC CACTGGTACCAGCAAAAACCCGGCAGCAGCCCCAAGTTGTGGATTTACTC AACTTCTAACTTGGCCTCAGGGGTACCGTCAAGATTTAGCGGATCTGGCA GTGGCACGAGTTATACTTTGACGATATCAAGCCTTCAACCGGAGGATTT GCCACCTATTACTGTCATCAGTATCATCGAAGCCCCTTGACCTTTGGGGG AGGGACAAAAGTGAAAATAAAA
49	Hu07, LCDR1	ACCGCTTCTTTGTCCGTTTCAAGTACCTACCTCCAC
50	Hu07, LCDR2	TCAACTTCTAACTTGGCCTCA
51	Hu07, LCDR3	CATCAGTATCATCGAAGCCCCTTGACC
52	Hu07, CAR (VL>VH)	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCA CGCCGCCAGGCCGGGATCCGACATACAAATGACACAGTCCCCCTCATCCT TGTCTGCTTCCGTAGGAGACCGGGTTACCATCACGTGCACCGCTTCTTTG TCCGTTTCAAGTACCTACCTCCACTGGTACCAGCAAAAACCCGGCAGCAGC CCCAAGTTGTGGATTTACTCAACTTCTAACTTGGCCTCAGGGGTACCGTCA AGATTTAGCGGATCTGGCAGTGGCACGAGTTATACTTTGACGATATCAAG CCTTCAACCGGAGGATTTGCGCACCTATTACTGTCATCAGTATCATCGAAG CCCCTTGACCTTTGGGGGAGGGACAAAAGTGAAAATAAAGGGGGAGGT GGAAGTGGTGGCGGTGGATCTGGTGGCGGCGGGTCAGAAGTACAGCTGG TTGAGAGTGGCGGGGGTCTCGTACAGCCCGGCGGGTCTCTTAGGCTCTCC TGTGCTGCTTCTGGTTTCTCCTTGACTAAATACGGGGTACATTGGGTTG CCAGGCCCTGGCAAAGGTCTTGAATGGGTGGGCGTCAAGTGGGCTGGC GGAAGCACTGATTATAATTCCGCATTGATGTCCCGATTCACTATTTCTAAG

		GATAATGCCAAGAACAGTCTCTATTTGCAAATGAACTCCCTGAGAGCGGA GGATACTGCCGTTTACTACTGTGCACGGGATCACCGAGACGCTATGGATT ACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTGACCGTAAGCTCCTCCGGAACCACGACG CCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCT GTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCAC ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGC CGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCA AACGGGGCAGAAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC CAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAG ACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAAT CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGG ACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCT GTACAATGAACTGCAGAAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG GGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCA GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG CCCTGCCCCCTCGC
53	Hu07, CAR (VH>VL)	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCA CGCCGCCAGGCCGGGATCCGAAGTACAGCTGGTTGAGAGTGGCGGGGGT CTCGTACAGCCCGCGGGTCTCTTAGGCTCTCCTGTGCTGCTTCTGGTTT CTCCTTGACTAAATACGGGGTACATTGGGTTGCCAGGCCCTGGCAAAG GTCTTGAATGGGTGGGCGTCAAGTGGGCTGGCGGAAGCACTGATTATAAT TCCGCATTGATGTCCCGATTCACTATTTCTAAGGATAATGCCAAGAACAGT CTCTATTTGCAAATGAACTCCCTGAGAGCGGAGGATACTGCCGTTTACTA CTGTGCACGGGATCACCGAGACGCTATGGATTACTGGGGTCAGGGTACCC TGGTGACCGTAAGCTCCGGGGGAGGTGGAAGTGGTGGCGGTGGATCTGG TGGCGGCGGGTCAGACATACAAATGACACAGTCCCCCTCATCCTTGCTG CTTCCGTAGGAGACCGGGTTACCATCACGTGCACCGCTTCTTTGTCCGTT TCAAGTACCTACCTCCACTGGTACCAGCAAAAACCCGGCAGCAGCCCCAAG TTGTGGATTTACTCAACTTCTAAGTGGCCTCAGGGGTACCGTCAAGATT AGCGGATCTGGCAGTGGCACGAGTTATACTTTGACGATATCAAGCCTTCA ACCGGAGGATTTGCCCACCTATTACTGTCATCAGTATCATCGAAGCCCCCT GACCTTTGGGGGAGGGACAAAAGTGGAAATAAAATCCGGAACCACGACGC CAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG TCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGGCGCAGTGCACA CGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCC GGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAA ACGGGGCAGAAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACC AGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG AAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGA CGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATC TAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGA CCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTG TACAATGAACTGCAGAAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGG GATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAG GGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGC CCTGCCCCCTCGC
54	Hu08, VH	GAGGTTCAAGTTGGTAGAGTCAGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCAGGTGGGT CCCTGCGCCTCAGCTGTGCAGCTTCCGGCTTTACTTTCTCAAGGAATGGT ATGTCCTGGGTACGGCAAACGCCGACAAACGCCTTGAGTGGGTAGCTAC CGTATCCTCTGGGGGCTCTTACATATACTATGCAGACTCTGTGAAAGGAA GATTTACAATTTACGCGACAATGCAAAAAATAGTTTGTACCTCCAAATGT CTAGTCTTAGGGCCGAGGATACTGCCGTCTACTACTGTGCACGCCAGGGA

		ACGACGGCTCTTGCTACCCGATTTTTCGACGTTTGGGGCCAAGGAACGTT GGTGACAGTTAGCAGT
55	Hu08, HCDR1	TCAAGGAATGGTATGTCC
56	Hu08, HCDR2	ACCGTATCCTCTGGGGGCTCTTACATATACTATGCAGACTCTGTGAAAGG A
57	Hu08, HCDR3	CAGGGAACGACGGCTCTTGCTACCCGATTTTTCGACGTT
58	Hu08, VL	GACATCCAAATGACTCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGTGCAAGCGTCGGAGA CCGGGTGACCATCACCTGTAAAGCGTCCCAGGATGTTGGAACGGCAGTAG CTTGGTATCAACAAATCCCAGGGAAGGCTCCAAAGCTCCTTATATACTCTG CTAGTTACAGGTCCACCGGGGTGCCGACCGATTCTCTGGCTCCGGGAGC GGCACTGACTTTTCATTATCATATTAGTAGTCTTCAACCTGAGGACTTTGCC ACCTATTATTGCCAGCACCCTACTCTGCGCCGTGGACTTTTCGGAGGAGG CACGAAGGTTGAAATTA
59	Hu08, LCDR1	AAAGCGTCCCAGGATGTTGGAACGGCAGTAGCT
60	Hu08, LCDR2	TCTGCTAGTTACAGGTCCACC
61	Hu08, LCDR3	CAGCACCCTACTCTGCGCCGTGGACT
62	Hu08, CAR (VH>VL)	ATGGCCTTACAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCA CGCCGCCAGGCCGGGATCCGAGGTTCACTTGGTAGAGTCAGGCGGTGGT CTGGTGCAGCCAGGTGGGTCCCTGCGCCTCAGCTGTGCAGCTTCCGGCTT TACTTTCTCAAGGAATGGTATGTCTGGGTACGGCAAACGCCGGACAAAC GCCTTGAGTGGGTAGCTACCGTATCCTCTGGGGGCTCTTACATATACTAT GCAGACTCTGTGAAAGGAAGATTTACAATTTACGCGACAATGCAAAAAAT AGTTTGTACCTCAAATGTCTAGTCTTAGGGCCGAGGATACTGCCGTCTA CTACTGTGCAGCCAGGGAACGACGGCTCTTGCTACCCGATTTTTCGACG TTTGGGGCCAAGGAACGTTGGTGACAGTTAGCAGTGGTGGAGGTGGGTG TGCGGAGGTGGAAGTGGTGGAGGCGGGTCCGACATCCAAATGACTCAG AGCCCCTCTAGCCTCAGTGCAAGCGTCGGAGACCGGGTGACCATCACCTG TAAAGCGTCCCAGGATGTTGGAACGGCAGTAGCTTGGTATCAACAAATCC CAGGGAAGGCTCCAAAGCTCCTTATATACTCTGCTAGTTACAGGTCCACC GGGGTGCCCGACCGATTCTCTGGCTCCGGGAGCGGCACTGACTTTTCATT CATCATTAGTAGTCTTCAACCTGAGGACTTTGCCACCTATTATTGCCAGCA CCACTACTCTGCGCCGTGGACTTTTCGGAGGAGGCACGAAGGTTGAAATTA AATCCGGAACACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACC ATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGC GGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC ATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGT TATCACCTTTACTGCAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA ACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTA GCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAAGTGAAGTGAAG TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCT CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACA AGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAAGCCGAGAAGGAAGAA CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCA CGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACG CCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
63	Hu08, CAR (VL>VH)	ATGGCCTTACAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCA CGCCGCCAGGCCGGGATCCGACATCCAAATGACTCAGAGCCCCTCTAGCC TCAGTGCAAGCGTCGGAGACCGGGTGACCATCACCTGTAAAGCGTCCCAG GATGTTGGAACGGCAGTAGCTTGGTATCAACAAATCCCAGGGAAGGCTCC AAAGCTCCTTATATACTCTGCTAGTTACAGGTCCACCGGGGTGCCCGACC GATTCTCTGGCTCCGGGAGCGGCACTGACTTTTCATTATCATATTAGTAGT

		CTTCAACCTGAGGACTTTGCCACCTATTATTGCCAGCACCCTACTCTGCG CCGTGGACTTTTCGGAGGAGGCACGAAGGTTGAAATTAAGGTGGAGGTG GGTCTGGCGGAGGTGGAAGTGGTGGAGGCGGGTCCGAGGTTCAATTGGT AGAGTCAGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCAGGTGGGTCCCTGCGCCTCAGC TGTGCAGCTTCCGGCTTTACTTTCTCAAGGAATGGTATGCTCTGGGTACG GCAAACGCCGACAAACGCCTTGAGTGGGTAGCTACCGTATCCTCTGGGG GCTCTTACATATACTATGCAGACTCTGTGAAAGGAAGATTTACAATTTAC GCGACAATGCAAAAAATAGTTTGTACCTCCAAATGTCTAGTCTTAGGGCC GAGGATACTGCCGTCTACTACTGTGCACGCCAGGGAACGACGGCTCTTGC TACCCGATTTTTTCGACGTTTGGGGCCAAGGAACGTTGGTGACAGTTAGCA GTTCCGGAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACC ATCGCGTCGACGCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGC GGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC ATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCTGTCACTGGT TATCACCTTTACTGCAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA ACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTA GCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAAGTGAAGTGAAG TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCT CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACA AGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCA CGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACG CCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
64	Hu07, scFv (VL > VH)	GACATACAAATGACACAGTCCCCCTCATCCTTGTCTGCTTCCGTAGGAGAC CGGGTTACCATCACGTGCACCGCTTCTTTGTCCGTTTCAAGTACCTACCTC CACTGGTACCAGCAAAAACCCGGCAGCAGCCCCAAGTTGTGGATTTACTC AACTTCTAACTTGGCCTCAGGGGTACCGTCAAGATTTAGCGGATCTGGCA GTGGCAGGAGTTATACTTTGACGATATCAAGCCTTCAACCGGAGGATTTT GCCACCTATTACTGTATCAGTATCATCGAAGCCCCCTGACCTTTGGGG AGGGACAAAAGTGAAATAAAAGGGGGAGGTGGAAGTGGTGGCGGTGGA TCTGGTGGCGGCGGGTCAGAAGTACAGCTGGTTGAGAGTGGCGGGGGTC TCGTACAGCCCGCGGGTCTCTTAGGCTCTCCTGTGCTGCTTCTGGTTT TCCTTGAATAAATACGGGGTACATTGGGTTGCGCAGGCCCTGGCAAAGG TCTTGAATGGGTGGGCGTCAAGTGGGCTGGCGGAAGCACTGATTATAATT CCGCATTGATGTCCCGATTCACTATTTCTAAGGATAATGCCAAGAAGCAGTC TCTATTTGCAAATGAAGTCCCTGAGAGCGGAGGATACTGCCGTTTACTACT GTGCACGGGATCACCGAGACGCTATGGATTACTGGGGTCAGGGTACCCTG GTGACCGTAAGCTCC
65	Hu08, scFv (VH > VL)	GAGGTTCAAGTTGGTAGAGTCAGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCAGGTGGGT CCCTGCGCCTCAGCTGTGCAGCTTCCGGCTTTACTTTCTCAAGGAATGGT ATGTCCTGGGTACGGCAAACGCCGACAAACGCCTTGAGTGGGTAGCTAC CGTATCCTCTGGGGGCTCTTACATATACTATGCAGACTCTGTGAAAGGAA GATTTACAATTTACGCGACAATGCAAAAAATAGTTTGTACCTCCAAATGT CTAGTCTTAGGGCCGAGGATACTGCCGTCTACTACTGTGCACGCCAGGGA ACGACGGCTCTTGCTACCCGATTTTTTCGACGTTTGGGGCCAAGGAACGTT GGTGACAGTTAGCAGTGGTGGAGGTGGGTCTGGCGGAGGTGGAAGTGGT GGAGGCGGGTCCGACATCCAAATGACTCAGAGCCCCCTTAGCCTCAGTGC AAGCGTCGGAGACCGGGTGACCATCACCTGTAAAGCGTCCCAGGATGTTG GAACGGCAGTAGCTTGGTATCAACAAATCCCAGGGAAGGCTCCAAAGCTC CTTATATACTCTGCTAGTTACAGGTCCACCGGGGTGCCCCAGCGATTCTCT GGCTCCGGGAGCGGCACTGACTTTTCATTATCATTAGTAGTCTTCAACCT

		GAGGACTTTGCCACCTATTATTGCCAGCACCCTACTCTGCGCCGTGGAC TTTCGGAGGAGGCACGAAGGTTGAAATTA
66	Hu08, scFv (VL > VH)	GACATCCAAATGACTCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGTGCAAGCGTCGGAGA CCGGGTGACCATCACCTGTAAAGCGTCCCAGGATGTTGGAACGGCAGTAG CTTGGTATCAACAAATCCCAGGGAAGGCTCCAAAGCTCCTTATATACTCTG CTAGTTACAGGTCCACCGGGGTGCCCCGACCGATTCTCTGGCTCCGGGAGC GGCACTGACTTTTCATTATCATTAGTAGTCTTCAACCTGAGGACTTTGCC ACCTATTATTGCCAGCACCCTACTCTGCGCCGTGGACTTTTCGGAGGAGG CACGAAGGTTGAAATTAAGGTGGAGGTGGGTCTGGCGGAGGTGGAAGT GGTGGAGGCGGGTCCGAGGTTGAGTTGGTAGAGTCAGGCGGTGGTCTGG TGCAGCCAGGTGGGTCCCTGCGCCTCAGCTGTGCAGCTTCCGGCTTTACT TTCTCAAGGAATGGTATGTCCTGGGTACGGCAAACGCCGACAAACGCCT TGAGTGGGTAGCTACCGTATCCTCTGGGGGCTCTTACATATACTATGCAG ACTCTGTGAAAGGAAGATTTACAATTTACGCGACAATGCAAAAAATAGTT TGTACCTCCAAATGTCTAGTCTTAGGGCCGAGGATACTGCCGTCTACTACT GTGCACGCCAGGGAACGACGGCTCTTGCTACCCGATTTTTCGACGTTTGG GGCCAAGGAACGTTGGTGACAGTTAGCAGT
67	Enlazador	GGGGGAGGTGGAAGTGGTGGCGGTGGATCTGGTGGCGGCGGGTCA
68	Enlazador	GGGGSGGGSGGGGS
69	Hu07, scFv (VH > VL)	GAAGTACAGCTGGTTGAGAGTGGCGGGGGTCTCGTACAGCCCGCGGGT CTCTTAGGCTCTCCTGTGCTGCTTCTGGTTTCTCCTTGACTAAATACGGGG TACATTGGGTTGCGCAGGCCCTGGCAAAGTCTTGAATGGGTGGGCGTC AAGTGGGCTGGCGGAAGCACTGATTATAATTCCGCATTGATGTCCCATT CACTATTTCTAAGGATAATGCCAAGAACAGTCTCTATTTGCAAATGAATC CCTGAGAGCGGAGGATACTGCCGTTTACTACTGTGCACGGGATCACCGAG ACGCTATGGATTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTGACCGTAAGCTCCGGG GGAGGTGGAAGTGGTGGCGGTGGATCTGGTGGCGGCGGGTCAGACATAC AAATGACACAGTCCCCCTCATCCTTGTCTGCTTCCGTAGGAGACCGGGT ACCATCACGTGCACCGCTTCTTTGTCCGTTTCAAGTACCTACCTCCACTGG TACCAGCAAAAACCCGGCAGCAGCCCCAAGTTGTGGATTTACTCAATTCT AACTTGGCCTCAGGGGTACCGTCAAGATTTAGCGGATCTGGCAGTGGCAC GAGTTATACTTTGACGATATCAAGCCTTCAACCGGAGGATTTCCGCCACCTA TACTGTCATCAGTATCATCGAAGCCCCTTGACCTTTGGGGGAGGGACAA AAGTGGAATAAAAA
70	806Hu07dnTGFβ RII	GCCACCATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCT GCTCCACGCCGCTCGGCCGATATTCTGATGACTCAATCTCCGTCTTCTAT GAGCGTGAGCTTGGGTGACACCGTCAGCATCACCTGTATTCCAGCCAGG ATATAAACTCAAATATCGGCTGGCTCCAGCAACGCCAGGCAAGTCATTCA AGGGGCTTATTTATCATGGCACCAATCTTGACGATGAAGTCCCATCACGC TTCAGCGGATCAGGCTCAGGTGCGGACTATTCCTTGACTATAAGTTCCCT CGAATCTGAGGATTTGCGCGACTATTATTGCGTACAATACGCCAGTTTCC CTGGACCTTCGGAGGCGGCACCAAATTGGAGATAAAAAGGGGTGGAGGA GGATCAGGCGGGGGTGAAGCGGCGGAGGAGGCAGCGACGTACAATGC AAGAATCCGGGCCGAGTTTGGTCAAGCCCTCTCAATCTCTTCTCTCACTT GCACGGTCACCGGATACTCCATAACCAGCGATTTTTCGTGGAATTGGATT CGACAATTTCCAGGGAATAAATTGGAATGGATGGGATATATCAGTTATTC TGGTAATACCAGATACAACCCGTCAATTGAAAAGTCGCATCTCTATAACAG AGACACTTCAAAGAATCAGTTCTTCTTCAGCTCAATTCTGTAACCATCGA AGATACTGCTACTTATTACTGTGTAACGGCGGGTCGAGGATTTCCCTACT GGGGCCAGGGTACACTGGTTACTGTTTCCGCCACCACTACCCAGCACCG AGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGT CCGGAGGCATGTAGACCCGCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTGC TTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGC

		GGGGTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCG GAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGGCCTGTGCAGA CTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAA GGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGC CTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGTCGGA GAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAAT GGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAG CTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGG GGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGAAGTGTACCAGGGACTCAGCA CCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGGCCCTGCCGCCT CGGGTTAACGGCTCCGGCGCTACAACTTTAGTCTGCTGAAACAGGCTGG AGATGTGGAGGAAAAACCCGGCCCTTCTAGAATGGCCTTACCAGTGACCG CCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCGCAGGCCGGGATCC GACATACAAATGACACAGTCCCCCTCATCCTTGCTGCTTCCGTAGGAGAC CGGGTTACCATCACGTGCACCGCTTCTTTGTCCGTTTCAAGTACCTACCTC CACTGGTACCAGCAAAAACCCGGCAGCAGCCCCAAGTTGTGGATTTACTC AACTTCTAAGTTGGCCTCAGGGGTACCGTCAAGATTTAGCGGATCTGGCA GTGGCACGAGTTATACTTTGACGATATCAAGCCTTCAACCGGAGGATTTT GCCACCTATTACTGTCATCAGTATCATCGAAGCCCCTTGACCTTTGGGGG AGGGACAAAAGTGAAATAAAAGGGGGAGGTGGAAGTGGTGGCGGTGGA TCTGGTGGCGGGGTGAGAAGTACAGCTGGTTGAGAGTGGCGGGGGTC TCGTACAGCCCGCGGGTCTCTTAGGCTCTCCTGTGCTGCTTCTGGTTTC TCCTTGACTAAATACGGGGTACATTGGGTTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGG TCTTGAATGGGTGGGCGTCAAGTGGGCTGGCGGAAGCACTGATTATAATT CCGCATTGATGTCCCGATTCACTATTTCTAAGGATAATGCCAAGAACAGTC TCTATTTGCAAATGAAGTCCCTGAGAGCGGAGGATACTGCCGTTTACTACT GTGCACGGGATCACCGAGACGCTATGGATTACTGGGGTCAGGGTACCTTG GTGACCGTAAGCTCCTCCGGAACACGACGCCAGCGCCGCGACCAAC ACCGGCGCCACCATCGCGTCGACGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGT GCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGC CTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTC TCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCC TGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGG AAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA CTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGG GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTAC GATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGC CGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGT AAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAAGTTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGA GGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG GACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCACTAGTGG CAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAG AATCCCGGCCCTAGGATGGGTGGGGGCTGCTCAGGGGCTGTGGCCGC TGCACATCGTCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTT CAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGT CAAGTTTCCAACTGTGTAATTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGA CAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAA GCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAA CACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTC TGGAAGATGCTGCTTCTCAAAGTGCAATTATGAAGGAAAAAAAAAAGCCT GGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTGATGAGTGCAATGACAA CATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGT CATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCA
--	--	--

		TATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACCGGCAGCAGAAGC TGAGTTCATAG
77	806Hu07dnTGFβ RII	ATMALPVTALLLPLALLLHAARPDILMTQSPSSMSVSLGDTVSI TCHSSQDIN SNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESED FADYYCVQYAQFPWTFGGGKLEIKRGGGSGGGGSGGGSDVQLQESGP SLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRY NPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGLTV TVSATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPRVNGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPSRMALPV TALLLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCTASLSVSSTYLH WYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATY YCHQYHRSPLTFGGGKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFSLT KYGVHWVRQAPGKGLEWVGK WAGGSTDYN S ALM SRFTISKDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHRDAMDYWGQGLTVTV SSSGTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPRTSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMGRGLLR GLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCQDVRS TCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF ILEDAA SPK CIMKEKKKPGETFFMCSSSDECDNIIFSEEYNTSNPDLLL VIF QVTGISLLPLLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLSS
78	806Hu08dnTGFβ RII	GCCACCATGGCCCTCCCTGT CACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCT GCTCCACGCCGCTCGGCCCGATATTCTGATGACTCAATCTCCGTCTTCTAT GAGCGTGAGCTTGGGTGACACCGTCAGCATCACCTGT CATTCCAGCCAGG ATATAAACTCAAATATCGGCTGGCTCCAGCAACGCCCAGGCAAGTCATTCA AGGGGCTTATTTATCATGGCACCAATCTTGACGATGAAGTCCCATCACGC TTCAGCGGATCAGGCTCAGGTGCGGACTATTCCTTGACTATAAGTTCCTT CGAATCTGAGGATTTGCGCGACTATTATTGCGTACAATACGCCCAGTTTCC CTGGACCTTCGGAGGCGGCACCAAATTGGAGATAAAAAGGGGTGGAGGA GGATCAGGCGGGGGTGAAGCGGCGGAGGAGGCAGCGACGTACAATGC AAGAATCCGGGCCGAGTTTGGTCAAGCCCTCTCAATCTCTTTCTCTCACTT GCACGGTCACCGGATACTCCATAACCAGCGATTTTTCGTGGAATTGGATT CGACAATTTCCAGGGAATAAATTGGAATGGATGGGATATATCAGTTATTC TGGAATACCAGATAACAACCGTCATTGAAAAGTCGCATCTCTATAACACG AGACACTTCAAAGAATCAGTTCTTCCTTCAGCTCAATTCTGTAACCATCGA AGATACTGCTACTTATTACTGTGTAAACGGCGGGTCGAGGATCCCCCTACT GGGGCCAGGGTACACTGGTTACTGTTTCCGCCACCACTACCCAGCACCG AGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGT CCGGAGGCATGTAGACCCGCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTC TTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGC GGGGTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCG GAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGCCTGTGCAGA CTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAA GGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGC CTACAAGCAGGGGCAGAACCACTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGA GAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAAT GGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAG CTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGG

		GGAACGCAGAAGAGGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCA CGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCCT CGGGTTAACGGCTCCGGCGCTACAACTTTAGTCTGCTGAAACAGGCTGG AGATGTGGAGGAAAAACCCGGCCCTTCTAGAATGGCCTTACCAGTGACCG CCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCC GACATCCAAATGACTCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGTGCAAGCGTCGGAGA CCGGGTGACCATCACCTGTAAAGCGTCCCAGGATGTTGGAACGGCAGTAG CTTGGTATCAACAAATCCCAGGGAAGGCTCCAAAGCTCCTTATATACTCTG CTAGTTACAGGTCCACCGGGGTGCCCAGCGATTCTCTGGCTCCGGGAGC GGCACTGACTTTTCATTATCATTAGTAGTCTTCAACCTGAGGACTTTGCC ACCTATTATTGCCAGCACCCTACTCTGCGCCGTGGACTTTTCGGAGGAGG CACGAAGGTTGAAATTAAGGTGGAGGTGGGTCTGGCGGAGGTGGAAGT GGTGGAGGCGGGTCCGAGGTTGAGTTGGTAGAGTCAGGCGGTGGTCTGG TGCAGCCAGGTGGGTCCCTGCGCCTCAGCTGTGCAGCTTCCGGCTTTACT TTCTCAAGGAATGGTATGTCCTGGGTACGGCAAACGCCGACAAACGCCT TGAGTGGGTAGCTACCGTATCCTCTGGGGGCTCTTACATATACTATGCAG ACTCTGTGAAAGGAAGATTTACAATTTACGCGACAATGCAAAAAATAGTT TGACCTCCAAATGTCTAGTCTTAGGGCCGAGGATACTGCCGTCTACTACT GTGCACGCCAGGGAACGACGGCTCTTGCTACCCGATTTTTTCGACGTTTGG GGCCAAGGAACGTTGGTGACAGTTAGCAGTTCCGGAACACGACGCCAGC GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCC TGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACGAG GGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGA CTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAACGG GGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTA CAAATACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCT GAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG AAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTC TCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG CCCCCTCGCACTAGTGGCAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATG CGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGATGGGTGCGGGGCTGCTC AGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCAC GATCCCACCGCACGTTGAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTG ACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTTCCACAACGTGTGTAATTTTGTGATGTGA GATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCA CCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAG AATGACGAGAACATAAAGTACAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCC TACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCAAAGTGCATTATGAAG GAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTGAT GAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCT GACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCA CTGGGAGTTGCCATATCTGTATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAAC CGGCAGCAGAAGCTGAGTTCATAG
79	806Hu08dnTGFβ RII	ATMALPVTALLLPLALLHAARPDLMTQSPSSMSVSLGDTVSIHSSQDIN SNIGWLQQRPGKSFGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESD FADYYCVQYAQFPWTFGGGKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSDVQLQESGP SLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRY NPSLKSRIITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDATYYCVTAGRGFPYWGQGLV TVSATTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW

		APLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPRVNGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPSRMALPV TALLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTAVA WYQQIPGKAPKLLIYSASYRSTGVPDRFSGSGSGTDFSFIISSLPEDFATYY CQHHYSAPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQTPDKRLEWVATVSSGGSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARQGTALATRFDFVWGQGT VTVSSGTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRTSGSGEGRGSLTCDVEENPGPRMGRG LLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDV RFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPY HDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEYNTSNPDLL LVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQQKLSS
80	806dnTGFβRII	GCCACCATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCT GCTCCACGCCGCTCGGCCGATATTCTGATGACTCAATCTCCGTCTTCTAT GAGCGTGAGCTTGGGTGACACCGTCAGCATCACCTGTCATTCCAGCCAGG ATATAAACTCAAATATCGGCTGGCTCCAGCAACGCCAGGCAAGTCATTCA AGGGGCTTATTTATCATGGCACCAATCTTGACGATGAAGTCCCATCACGC TTCAGCGGATCAGGCTCAGGTGCGGACTATTCCTTGACTATAAGTTCCT CGAATCTGAGGATTTGCGCGACTATTATTGCGTACAATACGCCAGTTTCC CTGGACCTTCGGAGGCGGCACCAAATTGGAGATAAAAAGGGGTGGAGGA GGATCAGGCGGGGGTGAAGCGGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG AAGAATCCGGGCCGAGTTTGGTCAAGCCCTCTCAATCTCTTTCTCTCACT GCACGGTCACCGGATACTCCATAACCGAGCATTTTTCGCTGGAATTGGATT CGACAATTTCCAGGGAATAAATTGGAATGGATGGGATATATCAGTTATTC TGGAATACAGATAACAACCGTCATTGAAAAGTCGCATCTCTATAACACG AGACACTTCAAAGAATCAGTTCTTCCTTCAGCTCAATTCTGTAAACCATCGA AGATACTGCTACTTATTACTGTGTAACGGCGGGTGCAGGATTTCCCTACT GGGGCCAGGGTACACTGGTACTGTTTCCGCCACCACTACCCAGCACCG AGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGT CCGGAGGCATGTAGACCCGCGAGTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCT TTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGC GGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCG GAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGCCTGTGCAGA CTAATCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAGGAA GGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGCGAGCGCAGATGCTCCAGC CTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGA GAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAAT GGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCTGTACAACGAG CTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGG GGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCA CCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCT CGGGTTAACGGCTCCGGCGCTACAACTTTAGTCTGCTGAAACAGGCTGG AGATGTGGAGGAAAACCCCGGCCCTATGGGTGGGGGCTGCTCAGGGGC CTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCC ACCGCACGTTGAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACAACAA CGGTGCAGTCAAGTTTCCCAACTGTGTAAATTTTGTGATGTGAGATTTTC CACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCAT

		CTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACG AGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATG ACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGGAAAAA AAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTGATGAGTGC AATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTG TTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGG AGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAATCGGCA GCAGAAGCTGAGTTCATAG
81	806dnTGFβRII	ATMALPVTALLPLALLLHAARPDILMTQSPSSMSVSLGDTVSIITCHSSQDIN SNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESED FADYYCVQYAQFPWTFGGGKLEIKRGGGSGGGGSGGGSDVQLQESGP SLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRY NPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGLTV TVSATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDLGYQG LSTATKDTYDALHMQALPPRVNGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGRGLLR GLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFS TCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF ILEDAAAPKCIKKEKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVI QVTGISLLPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLSS
82	Hu07dnTGFβRII	GCCACCATGGCCTTACCACTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCT GCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCCGACATACAAATGACACAGTCCCCCT CATCCTTGCTGCTTCCGTAGGAGACCGGGTTACCATCACGTGCACCGCT TCTTTGTCCGTTTCAAGTACCTACCTCCACTGGTACCAGCAAAAACCCGGC AGCAGCCCCAAGTTGTGGATTTACTCAACTTCTAATTGGCCTCAGGGGT ACCGTCAAGATTTAGCGGATCTGGCAGTGGCACGAGTTATACTTTGACGA TATCAAGCCTTCAACCGGAGGATTTGCCACCTATTACTGTCATCAGTATC ATCGAAGCCCCCTTGACCTTTGGGGGAGGGACAAAAGTGAAATAAAAGGG GGAGGTGGAAGTGGTGGCGGTGGATCTGGTGGCGGCGGGTCAGAAGTAC AGCTGGTTGAGAGTGGCGGGGTCTCGTACAGCCCGCGGGTCTCTTAG GCTCTCCTGTGCTGCTTCTGGTTTCTCCTTGACTAAATACGGGGTACATTG GGTTCGCCAGGCCCTGGCAAAGTCTTGAATGGGTGGGCGTCAAGTGG GCTGGCGGAAGCACTGATTATAATTCCGCATTGATGTCCCGATTCACTATT TCTAAGGATAATGCCAAGAACAGTCTCTATTTGCAATGAACTCCCTGAGA GCGGAGGATACTGCCGTTTACTACTGTGCACGGGATCACCGAGACGCTAT GGATTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTGACCGTAAGCTCCTCCGGAACCA CGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAG CCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAG TGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCC TTGGCCGGGACTTGTTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTA CTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATCAAACAACCATTTAT GAGACCACTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTT CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAG CGCAGACGCCCCCGCTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC CGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAG GCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAG ATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG CAGGCCCTGCCCCCTCGCGTTAACGGCTCCGGCGCTACAACTTTAGTCT GCTGAAACAGGCTGGAGATGTGGAGGAAAACCCCGGCCCTATGGGTCGG

		GGGCTGCTCAGGGGCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGACGCGTAT CGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTCAGAAGTCGGTTAATAACGACATGA TAGTCACTGACAACAACGGTGCAAGTTCACAACTGTGTAAATTTT GTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAAC TGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGT ATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACC CCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGT GCATTATGAAGGAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCT GTAGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACA CCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCC TCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCT ACCGCGTTAATCGGCAGCAGAAGCTGAGTTCATAG
83	Hu07dnTGFβRII	ATMALPVTALLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCTASLS VSSTYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPSRFGSGSGTSYLTITSSLQ PEDFATYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTKEYGVHWVRQAPGKLEWVGWKWAGGSTD YNSALMSRFTISKDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHRDAMDYWGQ GTLVTVSSSGTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRVNGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMG RGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD LLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLSS
84	Hu08dnTGFβRII	GCCACCATGGCCTTACCACTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCT GCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCCGACATCCAAATGACTCAGAGCCCCT CTAGCCTCAGTGCAAGCGTCGGAGACCGGGTGACCATCACCTGTAAAGCG TCCCAGGATGTTGGAACGGCAGTAGCTTGGTATCAACAAATCCCAGGGAA GGCTCCAAAGCTCCTTATATACTCTGCTAGTTACAGGTCCACCGGGGTGC CCGACCGATTCTCTGGCTCCGGGAGCGGCACTGACTTTTCATTATCATT GTAGTCTTCAACCTGAGGACTTTGCCACCTATTATTGCCAGCACCACTACT CTGCGCCGTGGACTTTCCGAGGAGGCACGAAGGTTGAAATTAAGGTGG AGGTGGGTCTGGCGGAGGTGGAAGTGGTGGAGGCGGGTCCGAGGTTTCAG TTGGTAGAGTCAGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCAGGTGGGTCCCTGCGCC TCAGCTGTGCAGCTTCCGGCTTTACTTTCTCAAGGAATGGTATGTCCTGG GTACGGCAAACGCCGGACAAACGCCTTGAGTGGGTAGCTACCGTATCCTC TGGGGGCTCTTACATATACTATGCAGACTCTGTGAAAGGAAGATTTACAA TTTCACGCGACAATGAAAAAATAGTTTGTACCTCCAAATGTCTAGTCTTA GGGCCGAGGATACTGCCGTCTACTACTGTGCACGCCAGGGAACGACGGCT CTTGCTACCCGATTTTTCGACGTTTGGGGCCAAGGAACGTTGGTGACAGT TAGCAGTTCGGAACACGACGCCAGCGCCGACCAACACCGGCGC CCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCA GCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATA TCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCA CTGGTTATCACCTTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATA TTCAAACAACCATTTATGAGACCACTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGC TGTAAGTCCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGT GAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACC AGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGA AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCG

		GAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGG GGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGTTAACGGCTCCGGCGC TACAACTTTAGTCTGCTGAAACAGGCTGGAGATGTGGAGGAAAACCCCG GCCCTATGGGTGCGGGGCTGCTCAGGGGCTGTGGCCGCTGCACATCGT CCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACGCGACGTTCAGAAGTCGG TTAATAACGACATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCAC AACTGTGTAAATTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAAT CCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAA GTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGAC AGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGC TGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTT TCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCT CAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAG TGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATC ATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAATCGGCAGCAGAAGCTGAGTTCATA G
85	Hu08dnTGFβRII	ATMALPVTALLLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQD VGTAVAWYQQIPGKAPKLLIYSASYRSTGVDPDRFSGSGGTDFSFIISSLQPE DFATYYCQHHYSAPWTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQTPDKRLEWVATVSSGGSYIYY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARQGTALATRFFDV WGQGTLLTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRVNGSGATNFSLLKQAGDVEENP GPMGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQ LCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYN TSNPDLLLVIFQVTGISLLPLGLVAISVIIIIFYCYRVNRQQKLSS

C. CARs bi-específicos en tándem y paralelo

- Se provee también en la presente un CAR en tándem, una célula (por ejemplo, célula
- 5 T) que comprende un CAR en tándem, una secuencia de aminoácidos que comprende un CAR en tándem y un ácido nucleico que codifica para un CAR en tándem. Un CAR en tándem comprende dos dominios de unión a antígeno separados por un enlazador, que están enlazados a un dominio de transmembrana y a un dominio intracelular (por ejemplo, 4-1BB y/o CD3ζ). En un aspecto, el CAR en tándem comprende un primer dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un primer scFv) separado
- 10 por un enlazador de un segundo dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un segundo scFv), seguido de un dominio de transmembrana y un dominio intracelular (por ejemplo, 4-1BB y/o CD3ζ). El primer y el segundo dominio de unión a antígeno pueden unirse a dos antígenos diferentes. Por ejemplo, un ejemplo de CAR en tándem comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende un scFv capaz de unirse a IL13Ra2, y el segundo dominio de unión a antígeno comprende un scFv capaz
- 15 de unirse al EGFR.

El enlazador del CAR en tándem que enlaza el primer y el segundo dominio de unión a antígeno puede tener varios tamaños, por ejemplo, cualquier número de aminoácidos. Por ejemplo, el enlazador puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos. En ciertas modalidades, el CAR en tándem comprende un enlazador de 5 aminoácidos. En ciertas modalidades, el CAR en tándem comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77, y puede ser codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 76. En ciertas modalidades, el CAR en tándem comprende un enlazador de 10 aminoácidos. En ciertas modalidades, el CAR en tándem comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, y puede ser codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 78. En ciertas modalidades, el CAR en tándem comprende un enlazador de 15 aminoácidos. En ciertas modalidades, el CAR en tándem comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81, y puede ser codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 80.

Se provee también en la presente un CAR paralelo, una célula (por ejemplo, célula T) que comprende un CAR paralelo, una secuencia de aminoácidos que comprende un CAR paralelo y un ácido nucleico que codifica para un CAR paralelo. Un CAR paralelo comprende dos CARs independientes enlazados por un enlazador escindible (por ejemplo, enlazador 2A). Por ejemplo, un ejemplo de CAR paralelo comprende un primer dominio de unión a antígeno (por ejemplo, scFv) enlazado a un primer dominio de transmembrana y a un primer dominio intracelular, un enlazador escindible (por ejemplo, enlazador 2A) y un segundo dominio de unión a antígeno (por ejemplo, scFv) enlazado a un segundo dominio de transmembrana y a un segundo dominio intracelular. Cuando el ácido nucleico se expresa en la célula, el enlazador (por ejemplo, enlazador 2A) es escindido, y dos CAR independientes se expresan en la superficie celular. En ciertas modalidades, el CAR paralelo comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2 y un segundo CAR capaz de unirse al EGFR.

25 D. Ácidos nucleicos y vectores de expresión

La presente descripción provee ácidos nucleicos que codifican para un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2a, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII). El ácido nucleico de la presente descripción puede comprender una secuencia de polinucleótidos que codifica para uno o más de los CARs descritos en la presente.

En una modalidad, un ácido nucleico de la presente descripción comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a IL13R α 2 de humano, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular; una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR que comprende un segundo dominio de unión a antígeno que se une al

receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular; y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII).

En ciertas modalidades, un ácido nucleico de la presente descripción comprende una
 5 primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un CAR capaz de unirse a IL13R α 2, y una
 segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo
 dominante (DN-TGF β RII). En ciertas modalidades, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno,
 un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno
 comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de
 10 complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de
 aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos
 GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos
 DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4); y/o una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones
 determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la
 15 secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5), LCDR2 comprende la secuencia de
 aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT
 (SEQ ID NO: 7).

En ciertas modalidades, el ácido nucleico codifica para un CAR y un receptor de tipo
 II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el dominio de unión a antígeno comprende
 20 una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos
 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 44, y/o una región
 variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%,
 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 48.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico codifica para un CAR y un receptor de tipo
 25 II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el dominio de unión a antígeno del CAR es
 un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) codificado por una secuencia de polinucleótidos por
 lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 64 o 69.

Se provee también un ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótidos
 que codifica para un receptor de antígenos quimérico (CAR) capaz de unirse a IL13R α 2, y un receptor
 30 de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el CAR comprende un dominio de
 unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de
 unión a antígeno comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones
 determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la
 secuencia de aminoácidos SRNGMS (SEQ ID NO: 12), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos
 35 TVSSGGSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 13), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos

QGTALATRFDDV (SEQ ID NO: 15); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos KASQDVGTAVA (SEQ ID NO: 16), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SASYRST (SEQ ID NO: 17), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QHHYSAPWT (SEQ ID NO: 18).

En ciertas modalidades, el ácido nucleico codifica para un CAR y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el dominio de unión a antígeno del CAR comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 54; y/o una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 58.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico codifica para un CAR y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el dominio de unión a antígeno del CAR es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 65 o 66.

En otro aspecto, la descripción provee un ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica para un CAR capaz de unirse a IL13R α 2, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno comprende: una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 44; y una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 48.

En otro aspecto, la descripción provee un ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica para un CAR capaz de unirse a IL13R α 2, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno comprende: una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 54; y una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 58.

En otro aspecto, la invención provee un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63 y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un DN-TGF β RII.

En ciertas modalidades, el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

Se provee también un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII).

En ciertas modalidades, el ácido nucleico codifica para un CAR y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el dominio de unión a antígeno del CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico codifica para un CAR y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el dominio de unión a antígeno es un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o 71.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico codifica para un CAR y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 35 o 75.

En ciertas modalidades, el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

Se provee también un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer y el segundo CAR comprenden cada uno un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular.

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del primer CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones

determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7).

5 En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del primer CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SRNGMS (SEQ ID NO: 12), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos TVSSGGSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 13), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QGTTALATRFFDV (SEQ ID NO: 15); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos KASQDVGTA (SEQ ID NO: 16), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SASYST (SEQ ID NO: 17), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QHHYSAPWT (SEQ ID NO: 18).

15 En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del primer CAR comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 44; y/o una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 48.

20 En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del primer CAR comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 54; y/o una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 58.

25 En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del primer CAR es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 138 o SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66.

30 En ciertas modalidades, la primera secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63.

35 En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos

GYISYSGNTRYNPSLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGPYW (SEQ ID NO: 27); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGINLDD (SEQ ID NO: 143) o HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYQFPWT (SEQ ID NO: 30).

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31, y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8, y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 19, y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 20.

En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del segundo CAR es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71. En ciertas modalidades, el dominio de unión a antígeno del segundo CAR es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 64.

En ciertas modalidades, la segunda secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 34. En ciertas modalidades, la segunda secuencia de polinucleótidos codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 75.

Se provee también un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento

epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1) o SRNGMS (SEQ ID NO: 12), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3) o TVSSGGSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 13), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4) o QGTTALATRFFDV (SEQ ID NO: 15); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5) o KASQDVGTAVA (SEQ ID NO: 16), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6) o SASYRST (SEQ ID NO: 17), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7) o QHHYSAPWT (SEQ ID NO: 18); y el segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNP SLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGPYW (SEQ ID NO: 27); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGINLDD (SEQ ID NO: 143) o HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30).

Se provee también un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 44 o 54; y una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 48 o 58; y el segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 73, y una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 74.

Se provee también un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de

polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el

5 primer CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 69, 64, 65 o 66; y el segundo CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 70.

10 Se provee también un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde la

15 primera secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 52 o 53 o 62 o 63; y la segunda secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 34.

En algunas modalidades, se provee un ácido nucleico de la presente descripción para

20 la producción de un CAR como se describe en la presente, por ejemplo, en una célula de mamífero. En algunas modalidades, un ácido nucleico de la presente descripción permite la amplificación del ácido nucleico que codifica para el CAR.

En algunas modalidades, un ácido nucleico de la presente descripción comprende una primera secuencia de polinucleótidos y una segunda secuencia de polinucleótidos. En algunas

25 modalidades, un ácido nucleico de la presente descripción comprende una primera secuencia de polinucleótidos, una segunda secuencia de polinucleótidos y una tercera secuencia de polinucleótidos. La primera y la segunda secuencia de polinucleótidos pueden ser separadas por un enlazador, y/o la segunda y la tercera secuencia de polinucleótidos pueden ser separadas por un enlazador. Un enlazador para su uso en la presente descripción permite que múltiples proteínas sean codificadas por

30 la misma secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia multicistónica o bicistónica), que se traducen como una poliproteína que se disocia en componentes de proteína separados. Por ejemplo, un enlazador para su uso en un ácido nucleico de la presente descripción que comprende una secuencia codificadora del CAR de IL13R α 2 y una secuencia codificadora del CAR del EGFR, permite que el CAR de IL13R α 2 y el CAR del EGFR sean traducidos como una poliproteína que se disocia en

35 CARs separados. En ciertas modalidades, el ácido nucleico comprende de 5' a 3' la primera secuencia

de polinucleótidos, un enlazador y la segunda secuencia de polinucleótidos. En ciertas modalidades, el ácido nucleico comprende de 5' a 3' la segunda secuencia de polinucleótidos, un enlazador y la primera secuencia de polinucleótidos. En ciertas modalidades, el ácido nucleico comprende de 5' a 3' la primera secuencia de polinucleótidos, un enlazador, la segunda secuencia de polinucleótidos, un enlazador y la tercera secuencia de polinucleótidos. En ciertas modalidades, el ácido nucleico comprende de 5' a 3' la segunda secuencia de polinucleótidos, un enlazador, la primera secuencia de polinucleótidos, un enlazador y la tercera secuencia de polinucleótidos.

En algunas modalidades, el enlazador comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un sitio de entrada interno al ribosoma (IRES). Como se usa en la presente, "un sitio de entrada interno al ribosoma" o "IRES" se refiere a un elemento que promueve la entrada interna directa al ribosoma al codón de iniciación, tal como ATG, de una región codificadora de proteínas, lo que lleva a la traducción independiente de la caperuza del gen. Los expertos en la técnica conocen varios sitios de entrada internos al ribosoma que incluyen, sin limitación, IRES obtenibles de fuentes de ARNm virales o celulares, por ejemplo, proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina (BiP); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); factor 2 de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento tipo insulina; factor de iniciación de la traducción eIF4G; factores de transcripción de levadura TFIID y HAP4; y los IRES que pueden obtenerse, por ejemplo, de cardiovirus, rinovirus, aftovirus, HCV, virus de la leucemia de murinos de Friend (FrMLV) y virus de la leucemia de murinos de Moloney (MoMLV). Los expertos en la técnica podrán seleccionar el IRES apropiado para su uso en la presente invención.

En algunas modalidades, el enlazador comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido auto-escindible. Como se usa en la presente, un "péptido auto-escindible" o "péptido 2A" se refiere a un oligopéptido que permite codificar múltiples proteínas como poliproteínas, las cuales se disocian en proteínas componentes tras la traducción. El término "auto-escindible" no implica una reacción de escisión proteolítica. Los expertos en la técnica conocen varios péptidos auto-escindibles o 2A que incluyen, pero no están limitados a, los que se encuentran en miembros de la familia de virus Picornaviridae, por ejemplo, el virus de la fiebre aftosa (FMDV), el virus de la rinitis equina A (ERAV0, virus Thosea asigna (TaV) y teschovirus porcino-1 (PTV-1); y cariovirus tales como Theilovirus y virus de la encefalomiocarditis. Los péptidos 2A derivados de FMDV, ERAV, PTV-1 y TaV son referidos en la presente como "F2A", "E2A", "P2A" y "T2A", respectivamente. Los expertos en la técnica podrán seleccionar el péptido auto-escindible adecuado para su uso en la presente invención.

En algunas modalidades, un enlazador comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica para un sitio de escisión de furina. La furina es una proteasa de expresión ubicua que reside en el trans-Golgi y procesa precursores de proteínas antes de su secreción. La furina se escinde en el extremo COOH-terminal de su secuencia de reconocimiento consenso. Los expertos en

la técnica conocen varias secuencias de reconocimiento consenso de furina (o "sitios de escisión de furina") que incluyen, pero no están limitadas a, Arg-X1-Lys-Arg o Arg-X1-Arg-Arg, X2-Arg-X1-X3-Arg (SEQ ID NO: 108) y Arg-X1-X1-Arg, tal como Arg-Gln-Lys-Arg (SEQ ID NO: 109), en donde X1 es cualquier aminoácido de ocurrencia natural, X2 es Lys o Arg, y X3 es Lys o Arg. Los expertos en la

5 técnica podrán seleccionar el sitio de escisión de furina apropiado para su uso en la presente invención.

En algunas modalidades, el enlazador comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una combinación de un sitio de escisión de furina y un péptido 2A. Algunos ejemplos incluyen, pero no están limitados a, un enlazador que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para furina y F2A, un enlazador que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para furina y E2A, un enlazador que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para furina y P2A, y un enlazador que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para furina y T2A. Los expertos en la técnica podrán seleccionar la combinación adecuada para su uso en la presente invención. En dichas modalidades, el enlazador puede comprender además una secuencia espaciadora entre la furina y el péptido 2A. Se conocen varias secuencias espaciadoras en la técnica que incluyen, pero no están limitadas a, espaciadores de glicina serina (GS), tales como (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 86) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 87), en donde n representa un número entero de por lo menos 1. Ejemplos de secuencias espaciadoras pueden comprender secuencias de aminoácidos que incluyen, pero no están limitadas a, GGSG (SEQ ID NO: 89), GGSGG (SEQ ID NO: 90), GSGSG (SEQ ID NO: 91), GSGGG (SEQ ID NO: 92), GGGSG (SEQ ID NO: 93), GSSSG (SEQ ID NO: 94), y

10 para furina y E2A, un enlazador que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para furina y P2A, y un enlazador que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para furina y T2A. Los expertos en la técnica podrán seleccionar la combinación adecuada para su uso en la presente invención. En dichas modalidades, el enlazador puede comprender además una secuencia espaciadora entre la furina y el péptido 2A. Se conocen varias secuencias espaciadoras en la técnica que incluyen, pero no están limitadas a, espaciadores de glicina serina (GS), tales como (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 86) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 87), en donde n representa un número entero de por lo menos 1. Ejemplos de secuencias espaciadoras pueden comprender secuencias de aminoácidos que incluyen, pero no están limitadas a, GGSG (SEQ ID NO: 89), GGSGG (SEQ ID NO: 90), GSGSG (SEQ ID NO: 91), GSGGG (SEQ ID NO: 92), GGGSG (SEQ ID NO: 93), GSSSG (SEQ ID NO: 94), y

15 similares. Los expertos en la técnica podrán seleccionar la secuencia espaciadora adecuada para su uso en la presente invención.

En algunas modalidades, un ácido nucleico de la presente descripción puede ser enlazado operablemente a un elemento de control de la transcripción, por ejemplo, un promotor y un intensificador, etc. Elementos promotores e intensificadores apropiados son conocidos por los expertos en la técnica.

20 en la técnica.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico que codifica para un CAR exógeno se encuentra en enlace funcional con un promotor. En ciertas modalidades, el promotor es un promotor de fosfoglicerato cinasa-1 (PGK).

Para la expresión en una célula bacteriana, los promotores adecuados incluyen, pero no están limitados a, lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P y trc. Para la expresión en una célula eucariótica, los promotores adecuados incluyen, pero no están limitados a, el promotor y los elementos intensificadores del gen de inmunoglobulina de cadena ligera y/o pesada; el promotor temprano inmediato de citomegalovirus; el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple; los promotores temprano y tardío de SV40; el promotor presente en las repeticiones terminales largas de un retrovirus; el promotor de metalotioneína-I de ratón; y varios promotores específicos de tejidos

30 no están limitados a, lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P y trc. Para la expresión en una célula eucariótica, los promotores adecuados incluyen, pero no están limitados a, el promotor y los elementos intensificadores del gen de inmunoglobulina de cadena ligera y/o pesada; el promotor temprano inmediato de citomegalovirus; el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple; los promotores temprano y tardío de SV40; el promotor presente en las repeticiones terminales largas de un retrovirus; el promotor de metalotioneína-I de ratón; y varios promotores específicos de tejidos

35 un retrovirus; el promotor de metalotioneína-I de ratón; y varios promotores específicos de tejidos

conocidos en la técnica. Se conocen en la técnica promotores reversibles adecuados, que incluyen promotores inducibles reversibles. Dichos promotores reversibles pueden aislarse y derivarse de numerosos organismos, como eucariontes y procariontes. La modificación de los promotores reversibles derivados de un primer organismo para su uso en un segundo organismo, por ejemplo, un primer procarionte y un segundo eucarionte, un primer eucarionte y un segundo procarionte, etc., es bien conocida en la técnica. Dichos promotores reversibles, y los sistemas basados en dichos promotores reversibles pero que también comprenden proteínas de control adicionales incluyen, pero no se limitan a, promotores regulados por alcohol (por ejemplo, promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa I (alcA), promotores que responden a las proteínas transactivadoras del alcohol (A1cR), etc.), promotores regulados por tetraciclina (por ejemplo, sistemas de promotores que incluyen TetActivators, TetON, TetOFF, etc.), promotores regulados por esteroides (por ejemplo, sistemas de promotores del receptor de glucocorticoides de rata, sistemas de promotores del receptor de estrógeno humano, sistemas de promotores de retinoides, sistemas de promotores de tiroides, sistemas de promotores de ecdisona, sistemas de promotores de mifepristona, etc.), promotores regulados por metales (por ejemplo, sistemas de promotores de metalotioneína, etc.), promotores regulados relacionados con la patogénesis (por ejemplo, promotores regulados por ácido salicílico, promotores regulados por etileno, promotores regulados por benzotiadiazol, etc.), promotores regulados por la temperatura (por ejemplo, promotores inducibles por choque térmico (por ejemplo, HSP-70, HSP-90, promotor de choque térmico de soya, etc.), promotores regulados por la luz, promotores inducibles sintéticos, y similares.

En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de células CD8, un promotor específico de células CD4, un promotor específico de neutrófilos o un promotor específico de células NK. Por ejemplo, puede usarse un promotor del gen CD4; véase, por ejemplo, Salmon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:7739; y Marodon *et al.*, Blood 101:3416 (2003). Como otro ejemplo, puede usarse un promotor del gen CD8. Puede lograrse la expresión específica de células NK mediante el uso de un promotor NcrI (p46); véase, por ejemplo, Eckelhart *et al.*, Blood (2011) 117:1565.

Para la expresión en una célula de levadura, un promotor adecuado es un promotor constitutivo tal como un promotor ADH1, un promotor PGK1, un promotor ENO, un promotor PYK1, y similares; o un promotor regulable tal como un promotor GAL1, un promotor GAL10, un promotor ADH2, un promotor PHOS, un promotor CUP1, un promotor GALT, un promotor MET25, un promotor MET3, un promotor CYC1, un promotor HIS3, un promotor ADH1, un promotor PGK, un promotor GAPDH, un promotor ADC1, un promotor TRP1, un promotor URA3, un promotor LEU2, un promotor ENO, un promotor TP1 y AOX1 (por ejemplo, para su uso en *Pichia*). La selección del vector y promotor apropiados está dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica. Promotores adecuados para su

uso en células hospederas procarióticas incluyen, pero no se limitan a, un promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7; un promotor *trp*; un promotor del operón *lac*; un promotor híbrido, por ejemplo, un promotor híbrido *lac/tac*, un promotor híbrido *tac/trc*, un promotor *trp/lac*, un promotor T7/*lac*; un promotor *trc*; un promotor *tac*, y similares; un promotor *araBAD*; promotores regulados *in vivo*, tal como un promotor *ssaG* o un promotor relacionado (véase, por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos No. 20040131637), un promotor *pagC* (Pulkkinen y Miller, J. Bacteriol. (1991) 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89(21): 10079-83), un promotor *nirB* (Harborne *et al.*, Mol. Micro. (1992) 6:2805-2813), y similares (véase, por ejemplo, Dunstan *et al.*, Infect. Immun. (1999) 67:5133-5141; McKelvie *et al.*, Vaccine (2004) 22:3243-3255; y Chatfield *et al.*, Biotechnol. (1992) 10:888-892); un promotor *sigma70*, por ejemplo, un promotor *sigma70* consenso (véase, por ejemplo, los Nos. de acceso del GenBank AX798980, AX798961 y AX798183); un promotor de fase estacionaria, por ejemplo, un promotor *dps*, un promotor *spv*, y similares; un promotor derivado de la isla de patogenicidad SPI-2 (véase, por ejemplo, el documento WO96/17951); un promotor *actA* (véase, por ejemplo, Shetron-Rama *et al.*, Infect. Immun. (2002) 70:1087-1096); un promotor *rpsM* (véase, por ejemplo, Valdivia y Falkow Mol. Microbiol. (1996) 22:367); un promotor *tet* (véase, por ejemplo, Hillen, W. y Wissmann, A. (1989) en Saenger, W. y Heinemann, U. (eds.), Topics in Molecular and Structural Biology, Protein--Nucleic Acid Interaction. Macmillan, Londres, Reino Unido, vol. 10, págs. 143-162); un promotor SP6 (véase, por ejemplo, Melton *et al.*, Nucl. Acids Res. (1984) 12:7035); y similares. Los promotores fuertes adecuados para su uso en procariontes tales como *Escherichia coli* incluyen, pero no se limitan a, *Trc*, *Tac*, *T5*, *T7* y *PLambda*. Ejemplos no limitativos de operadores para su uso en células hospederas bacterianas incluyen un operador promotor de lactosa (la proteína represora LacI cambia de conformación cuando entra en contacto con lactosa, lo que evita que la proteína represora LacI se una al operador), un operador promotor de triptófano (cuando forma un complejo con triptófano, la proteína represora TrpR tiene una conformación que se une al operador; en ausencia de triptófano, la proteína represora TrpR tiene una conformación que no se une al operador) y un operador promotor *tac* (véase, por ejemplo, deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80:21-25).

Otros ejemplos de promotores adecuados incluyen la secuencia de promotor temprana inmediata de citomegalovirus (CMV). Esta secuencia de promotor es una secuencia de promotor constitutiva fuerte capaz de generar altos niveles de expresión de cualquier secuencia de polinucleótidos enlazada operablemente a la misma. Pueden usarse también otras secuencias de promotor constitutivas que incluyen, pero no están limitadas a, el promotor temprano del virus simiano 40 (SV40), el promotor de la repetición terminal larga (LTR) del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) o del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor MoMuLV, el promotor del virus de la leucemia aviar, el promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, el promotor del virus

del sarcoma de Rous, el promotor de EF-1 alfa, así como promotores de genes humanos tales como, pero no limitados a, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina cinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles se contemplan también como parte de la invención. El uso de

5 un promotor inducible provee un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia de polinucleótidos a la que está enlazada operablemente cuando se desea dicha expresión, o de desactivarla cuando no se desea. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no están limitados a, un promotor de metalotioneína, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina. En ciertas modalidades, la invención provee una secuencia de

10 polinucleótidos que codifica para un CAR (por ejemplo, CAR biespecífico, CAR en tándem, CAR paralelo, etc.) que comprende un promotor inducible. En ciertas modalidades, el promotor inducible promueve la expresión de la secuencia enlazada operablemente (por ejemplo, CAR) tras la activación de células T. Las células T (por ejemplo, células T CAR) pueden ser modificadas con este promotor para expresar ARN o aminoácidos diseñados.

15 En algunas modalidades, el locus, la construcción o el transgen que contiene el promotor adecuado es conmutado irreversiblemente mediante la inducción de un sistema inducible. Sistemas adecuados para la inducción de un cambio irreversible son bien conocidos en la técnica; por ejemplo, la inducción de un cambio irreversible puede usar una recombinación mediada por Cre-lox (véase, por ejemplo, Fuhrmann-Benzakein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 28: e99, cuya

20 descripción se incorpora en la presente como referencia). Cualquier combinación adecuada de recombinasa, endonucleasa, ligasa, sitios de recombinación, etc., conocida en la técnica, puede usarse para generar un promotor conmutable irreversiblemente. Los métodos, mecanismos y requisitos para realizar la recombinación específica de sitio, descritos en otras partes de la presente, se usan para generar promotores conmutados irreversiblemente, y son bien conocidos en la técnica; véase, por

25 ejemplo, Grindley *et al.* Annual Review of Biochemistry (2006) 567-605; y Tropp, Molecular Biology (2012) (Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, Mass.), cuyas descripciones se incorporan en la presente como referencia.

En algunas modalidades, un ácido nucleico de la presente descripción comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica para un cassette de expresión inducible por el

30 CAR. En una modalidad, el cassette de expresión inducible por el CAR se usa para la producción de un producto polipeptídico transgénico que es liberado tras la señalización del CAR. Véase, por ejemplo, Chmielewski y Abken, Expert Opin. Biol. Ther. (2015) 15(8): 1145-1154; y Abken, Immunotherapy (2015) 7(5): 535-544. En algunas modalidades, un ácido nucleico de la presente descripción comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una citocina enlazada

35 operablemente a un promotor que responde a la activación de células T. En algunas modalidades, la

citocina enlazada operablemente a un promotor que responde a la activación de células T está presente en una secuencia de ácido nucleico independiente. En una modalidad, la citocina es IL-12.

Un ácido nucleico de la presente descripción puede estar presente dentro de un vector de expresión y/o un vector de clonación. Un vector de expresión puede incluir un marcador seleccionable, un origen de replicación, y otras características que facilitan la replicación y/o el mantenimiento del vector. Entre los vectores de expresión adecuados se incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores virales, etc. Los expertos en la técnica conocen una gran cantidad de vectores y promotores adecuados; muchos de ellos están disponibles comercialmente para generar una construcción recombinante. Los siguientes vectores se proveen a manera de ejemplo, y no deben interpretarse como limitativos: Bacterianos: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, California, USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 y pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Eucarióticos: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia).

Los vectores de expresión presentan generalmente sitios de restricción convenientes ubicados cerca de la secuencia de promotor para facilitar la inserción de secuencias de ácidos nucleicos que codifican para proteínas heterólogas. Puede estar presente un marcador seleccionable operativo en el hospedero de expresión. Vectores de expresión adecuados incluyen, pero no están limitados a, vectores virales (por ejemplo, vectores virales basados en el virus de la vaccinia; poliovirus; adenovirus (véase, por ejemplo, Li *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1994) 35: 2543-2549; Borrás *et al.*, Gene Ther. (1999) 6: 515-524; Li y Davidson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 7700-7704; Sakamoto *et al.*, H. Gene Ther. (1999) 5: 1088-1097; los documentos WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655); virus adeno-asociados (véase, por ejemplo, Ali *et al.*, Hum. Gene Ther. (1998) 9: 81-86, Flannery *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 6916-6921; Bennett *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1997) 38: 2857-2863; Jomary *et al.*, Gene Ther. (1997) 4:683 690, Rolling *et al.*, Hum. Gene Ther. (1999) 10: 641-648; Ali *et al.*, Hum. Mol. Genet. (1996) 5: 591-594; Srivastava en el documento WO 93/09239, Samulski *et al.*, J. Vir. (1989) 63: 3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166: 154-165; y Flotte *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 10613-10617); SV40; virus del herpes simple; virus de la inmunodeficiencia humana (véase, por ejemplo, Miyoshi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 10319-23; Takahashi *et al.*, J. Virol. (1999) 73: 7812-7816); un vector retroviral (por ejemplo, virus de la leucemia de murinos, virus de la necrosis del bazo, y vectores derivados de retrovirus tales como virus del sarcoma de Rous, virus del sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del sarcoma mieloproliferativo y virus del tumor mamario); y similares.

Otros vectores de expresión adecuados para su uso son, por ejemplo y sin limitación, un vector de lentivirus, un vector gamma de retrovirus, un vector de virus espumoso, un vector de

virus adeno-asociado, un vector de adenovirus, un vector de poxvirus, un vector de virus del herpes, un vector viral híbrido diseñado, un vector mediado por transposones, etc. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica, y se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus útiles como vectores incluyen, pero no están limitados a, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del herpes y lentivirus.

En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en por lo menos un organismo, una secuencia de promotor, sitios de endonucleasa de restricción convenientes, y uno o más marcadores seleccionables (véase, por ejemplo, los documentos WO 01/96584; y WO 01/29058; y la patente de los Estados Unidos No. 6,326,193).

En algunas modalidades, puede usarse un vector de expresión (por ejemplo, un vector lentiviral) para introducir el CAR en una célula inmune o en uno de sus precursores (por ejemplo, una célula T). Por consiguiente, un vector de expresión (por ejemplo, un vector lentiviral) de la presente invención puede comprender un ácido nucleico que codifica para un CAR. En algunas modalidades, el vector de expresión (por ejemplo, un vector lentiviral) comprenderá elementos adicionales que facilitarán la expresión funcional del CAR codificado. En algunas modalidades, un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR comprende además un promotor de mamífero. En una modalidad, el vector comprende además un promotor del factor de elongación 1-alfa (promotor EF-1 α). El uso de un promotor EF-1 α puede aumentar la eficiencia de la expresión de transgenes hacia el extremo 3' (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica para un CAR). Los promotores fisiológicos (por ejemplo, el promotor EF-1 α) pueden ser menos propensos a inducir genotoxicidad mediada por la integración, y pueden anular la capacidad del vector retroviral para transformar células madre. Otros promotores fisiológicos adecuados para su uso en un vector (por ejemplo, un vector lentiviral) son conocidos por los expertos en la técnica, y pueden ser incorporados en un vector de la presente invención. En algunas modalidades, el vector (por ejemplo, un vector lentiviral) comprende además una secuencia no esencial que actúa en cis que puede mejorar los títulos y la expresión génica. Un ejemplo no limitativo de una secuencia no esencial que actúa en cis, es la secuencia central del tracto de polipurina y la secuencia de terminación central (cPPT/CTS), que es importante para la transcripción inversa eficiente y la incorporación nuclear. Otras secuencias no esenciales que actúan en cis son conocidas por los expertos en la técnica, y pueden ser incorporadas en un vector (por ejemplo, un vector lentiviral) de la presente invención. En algunas modalidades, el vector comprende además un elemento regulador post-transcripción. Los elementos reguladores post-transcripción pueden mejorar la traducción del ARN, la expresión transgénica, y pueden estabilizar los transcritos de ARN. Un ejemplo de elemento regulador post-transcripción es el elemento regulador post-transcripción del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). Por consiguiente, en algunas

modalidades, un vector de la presente invención comprende además una secuencia de WPRE. Varios elementos reguladores post-transcripción son conocidos por los expertos en la técnica, y pueden ser incorporados en un vector (por ejemplo, un vector lentiviral) de la presente invención. Un vector de la presente invención puede comprender además elementos adicionales tales como un elemento de respuesta rev (RRE) para el transporte de ARN, secuencias de empaquetado, y repeticiones terminales largas (LTRs) 5' y 3'. El término "repetición terminal larga" o "LTR" se refiere a dominios de pares de bases localizados en los extremos de las moléculas de ADN retrovirales, que comprenden las regiones U3, R y U5. Las LTRs desempeñan generalmente funciones necesarias para la expresión de genes retrovirales (por ejemplo, promoción, iniciación y poliadenilación de transcritos génicos) y para la replicación viral. En una modalidad, un vector (por ejemplo, el vector lentiviral) de la presente invención incluye una LTR con delección de U3 en 3'. Por consiguiente, un vector (por ejemplo, un vector lentiviral) de la presente invención puede comprender cualquier combinación de los elementos descritos en la presente para mejorar la eficiencia de la expresión funcional de transgenes. Por ejemplo, un vector (por ejemplo, un vector lentiviral) de la presente invención puede comprender una secuencia de WPRE, una secuencia de cPPT, una secuencia de RRE, una LTR en 5', una LTR con delección de U3 en 3', además de un ácido nucleico que codifica para un CAR.

Los vectores de la presente invención pueden ser vectores de auto-inactivación. Como se usa en la presente, el término "vector de auto-inactivación" se refiere a vectores en los que la región de promotor del intensificador de LTR 3' (región U3) ha sido modificada (por ejemplo, mediante delección o sustitución). Un vector de auto-inactivación puede impedir la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Por consiguiente, un vector de auto-inactivación puede infectar y posteriormente integrarse en el genoma del hospedero (por ejemplo, el genoma de un mamífero) sólo una vez, y no puede transmitirse a otras regiones. Por consiguiente, los vectores de auto-inactivación pueden reducir considerablemente el riesgo de crear un virus con capacidad de replicación.

En algunas modalidades, un ácido nucleico de la presente invención puede ser ARN, por ejemplo, ARN sintetizado *in vitro*. Los expertos en la técnica conocen métodos para la síntesis *in vitro* de ARN; cualquier método conocido puede usarse para sintetizar ARN que comprende una secuencia que codifica para un CAR de la presente descripción. Métodos para introducir ARN en una célula hospedera son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Zhao *et al.*, Cancer Res. (2010) 15: 9053. La introducción de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un CAR de la presente descripción en una célula hospedera puede llevarse a cabo *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, una célula hospedera (por ejemplo, una célula NK, un linfocito T citotóxico, etc.) puede ser electroporada *in vitro* o *ex vivo* con ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un CAR de la presente descripción.

Para evaluar la expresión de un polipéptido o porciones del mismo, el vector de

expresión que será introducido en una célula puede contener también un gen marcador seleccionable, un gen reportero, o ambos, para facilitar la identificación y selección de células expresivas de la población de células que se desea transfectar o infectar usando vectores virales. En algunas modalidades, el marcador seleccionable puede ser llevado en un fragmento de ADN independiente, y
 5 puede usarse en un procedimiento de co-transfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes reporteros pueden ser flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células hospederas. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, sin limitación, los genes de resistencia a antibióticos.

Los genes reporteros se usan para identificar células potencialmente transfectadas y
 10 evaluar la funcionalidad de las secuencias reguladoras. En general, un gen reportero es un gen que no está presente en o es expresado por el organismo o tejido receptor y que codifica para un polipéptido cuya expresión se manifiesta mediante alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, la actividad enzimática. La expresión del gen reportero se evalúa en un momento adecuado tras la introducción del ADN en las células receptoras. Los genes reporteros adecuados pueden incluir,
 15 sin limitación, los genes que codifican para luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada, o el gen de la proteína verde fluorescente (véase, por ejemplo, Ui-Tei *et al.*, 2000 FEBS Letters 479: 79-82).

E. Células inmunes modificadas

20 La presente invención provee células inmunes modificadas o precursores de las mismas (por ejemplo, células T) que comprenden un receptor de antígenos quimérico (CAR) capaz de unirse a IL13R α 2 (por ejemplo, IL13R α 2 de humano), un CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII). La invención incluye también células inmunes modificadas o precursores de
 25 las mismas que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente o cualquiera de los vectores descritos en la presente.

Un aspecto de la invención incluye una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y
 30 un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII). El primer CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs). HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1) o SRNGMS (SEQ ID NO: 12), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3) o TVSSGGSYIYYADSVK (SEQ ID NO: 13), y HCDR3 comprende la secuencia de
 35 aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4) o QGTTALATRFFDV (SEQ ID NO: 15). El primer CAR

comprende también una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs). LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5) o KASQDVGTA (SEQ ID NO: 16), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6) o SASYST (SEQ ID NO: 17), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7) o QHHYSAPWT (SEQ ID NO: 18). El segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs). HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNPSLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGFPYW (SEQ ID NO: 27). El segundo CAR comprende también una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs). LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGINLDD (SEQ ID NO: 143) o HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAFQFWT (SEQ ID NO: 30).

Otro aspecto de la invención incluye una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8 o 19, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9 o 20. El segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 8, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 20.

Se provee también una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22; y el segundo CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de

aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 71.

5 Se provee también una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23 o 24; y el segundo CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 35 o 75.

10 En ciertas modalidades, el segundo CAR es capaz de unirse a una isoforma del EGFR seleccionada del grupo que consiste en EGFR de tipo silvestre (wtEGFR), EGFR mutado, EGFR^{A289V}, EGFR^{A289D}, EGFR^{A289T}, EGFR^{A289T}, EGFR^{R108K}, EGFR^{R108G}, EGFR^{G598V}, EGFR^{D126Y}, EGFR^{C628F}, EGFR^{R108K/A289V}, EGFR^{R108K/D126Y}, EGFR^{A289V/G598V}, EGFR^{A289V/C628F} y variante II del EGFR, o cualquier combinación de los mismos.

15 En ciertas modalidades, la célula es una célula T modificada. En ciertas modalidades, la célula es una célula autóloga. En ciertas modalidades, la célula es una célula autóloga obtenida de un sujeto humano.

F. Fuentes de células inmunes

20 En ciertas modalidades, se obtiene una fuente de células inmunes (por ejemplo, células T) de un sujeto para su manipulación *ex vivo*. Las fuentes de células inmunes para la manipulación *ex vivo* pueden incluir también, por ejemplo, sangre de donador autóloga o heteróloga, sangre de cordón umbilical, o médula ósea. Por ejemplo, la fuente de células inmunes puede provenir del sujeto que será tratado con las células inmunes modificadas de la invención, por ejemplo, su
25 sangre, sangre de cordón umbilical o médula ósea. Ejemplos no limitativos de sujetos incluyen humanos, perros, gatos, ratones, ratas y sus especies transgénicas. De preferencia, el sujeto es un humano.

Las células inmunes pueden obtenerse de varias fuentes, que incluyen sangre, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de nódulos linfáticos, tejido de bazo, cordón
30 umbilical, linfa u órganos linfoides. Las células inmunes son células del sistema inmune, tales como las células de la inmunidad innata o adaptativa, por ejemplo, células mieloides o linfoides, que incluyen linfocitos, típicamente células T o células NK. Otros ejemplos de células incluyen células madre, tales como células madre multipotentes y pluripotentes, incluyendo las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). En algunos aspectos, las células son células humanas. Con referencia al sujeto que
35 será tratado, las células pueden ser alogénicas y/o autólogas. Las células son típicamente células

primarias, tales como las aisladas directamente de un sujeto y/o aisladas de un sujeto y congeladas.

En ciertas modalidades, la célula inmune es una célula T, por ejemplo, una célula T CD8+ (por ejemplo, una célula T CD8+ sin tratamiento previo, una célula T de memoria central o una célula T de memoria efectora), una célula T CD4+, una célula T asesina natural (célula NKT), una
 5 célula T reguladora (Treg), una célula T de memoria de células madre, una célula progenitora linfoide, una célula madre hematopoyética, una célula asesina natural (célula NK) o una célula dendrítica. En algunas modalidades, las células son monocitos o granulocitos, por ejemplo, células mieloides, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos (células cebadas), eosinófilos y/o basófilos. En una modalidad, la célula objetivo es una célula madre pluripotente inducida (iPS) o una célula derivada
 10 de una célula iPS, por ejemplo, una célula iPS generada a partir de un sujeto, manipulada para alterar (por ejemplo, inducir una mutación en) o manipular la expresión de uno o más genes objetivo, y diferenciada en, por ejemplo, una célula T, por ejemplo, una célula T CD8+ (por ejemplo, una célula T CD8+ sin tratamiento previo, una célula T de memoria central o una célula T de memoria efectora), una célula T CD4+, una célula T de memoria de células madre, una célula progenitora linfoide o una
 15 célula madre hematopoyética.

En algunas modalidades, las células incluyen uno o más subgrupos de células T u otros tipos de células, tales como poblaciones de células T completas, células CD4+, células CD8+ y subpoblaciones de las mismas, tales como aquellas definidas por función, estado de activación, madurez, potencial de diferenciación, expansión, recirculación, localización, y/o capacidades de
 20 persistencia, especificidad por el antígeno, tipo de receptor de antígenos, presencia en un órgano o compartimiento particular, perfil de secreción de marcadores o citocinas y/o grado de diferenciación. Entre los subtipos y subpoblaciones de células T y/o de células T CD4+ y/o CD8+, se encuentran las células T sin tratamiento previo (TN), las células T efectoras (TEFF), las células T de memoria y sus subtipos, tales como las células T de memoria de células madre (TSCM), las células T de memoria central (TCM), las células T de memoria efectoras (TEM) o las células T de memoria efectoras
 25 terminalmente diferenciadas, los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), las células T inmaduras, las células T maduras, las células T auxiliares, las células T citotóxicas, las células T invariantes asociadas a las mucosas (MAIT), las células T reguladoras (Treg) de ocurrencia natural y adaptativas, las células T auxiliares, tales como las células TH1, TH2, TH3, TH17, TH9, TH22, las células T auxiliares foliculares,
 30 las células T alfa/beta y las células T delta/gamma. En ciertas modalidades, puede usarse cualquier número de líneas de células T disponibles en la técnica.

En algunas modalidades, los métodos incluyen aislar células inmunes del sujeto, prepararlas, procesarlas, cultivarlas y/o diseñarlas. En algunas modalidades, la preparación de las células diseñadas incluye uno o más pasos de cultivo y/o preparación. Las células para diseño como
 35 se describe, pueden aislarse de una muestra, tal como una muestra biológica, por ejemplo, obtenida

o derivada de un sujeto. En algunas modalidades, el sujeto del que se aísla la célula padece la enfermedad o condición, necesita terapia celular, o se le administrará dicha terapia. En algunas modalidades, el sujeto es un humano que necesita una intervención terapéutica particular, tal como la terapia celular adoptiva para la cual se aíslan, procesan y/o diseñan las células. Por consiguiente,

5 en algunas modalidades, las células son células primarias, por ejemplo, células humanas primarias. Las muestras incluyen tejido, fluidos y otras muestras tomadas directamente del sujeto, así como muestras resultantes de uno o más pasos de procesamiento, tales como separación, centrifugación, ingeniería genética (por ejemplo, transducción con un vector viral), lavado y/o incubación. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra

10 procesada. Las muestras biológicas incluyen, pero no están limitadas a, fluidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, líquido ceforraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, y muestras de tejidos y órganos, incluyendo las muestras procesadas derivadas de los mismos.

En algunos aspectos, la muestra de la que se derivan o aíslan las células es sangre o una muestra derivada de sangre, o es o se deriva de un producto de aféresis o leucoféresis. Ejemplos

15 de muestras incluyen sangre entera, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, nódulo linfático, tejido linfoide asociado al intestino, tejido linfoide asociado a mucosas, bazo, otros tejidos linfoides, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello uterino, testículos, ovarios, amígdalas u otros órganos, y/o células derivadas de los mismos. En el contexto de la terapia celular,

20 por ejemplo, la terapia celular adoptiva, las muestras incluyen muestras de fuentes autólogas y alogénicas.

En algunas modalidades, las células se derivan de líneas de células, por ejemplo, líneas de células T. En algunas modalidades, las células se obtienen de una fuente xenogénica, por ejemplo, de ratón, rata, primate no humano y cerdo. En algunas modalidades, el aislamiento de las células

25 incluye uno o más pasos de preparación o separación de células no basados en la afinidad. En algunos ejemplos, las células se lavan, centrifugan y/o incuban en presencia de uno o más reactivos, por ejemplo, para remover componentes no deseados, enriquecer con componentes deseados, y lisar o remover células sensibles a reactivos específicos. En algunos ejemplos, las células se separan en función de una o más propiedades, tales como la densidad, las propiedades adherentes, el tamaño, la

30 sensibilidad y/o la resistencia a componentes particulares.

En algunos ejemplos, se obtienen células de la sangre circulante de un sujeto, por ejemplo, mediante aféresis o leucoféresis. Las muestras, en algunos aspectos, contienen linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas, y en algunos aspectos contienen células distintas de glóbulos rojos y plaquetas.

35 En algunas modalidades, las células sanguíneas obtenidas del sujeto se lavan, por ejemplo, para

remover la fracción plasmática y ponerlas en un regulador de pH o medio adecuado para los pasos de procesamiento posteriores. En algunas modalidades, las células se lavan con solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS). En algunos aspectos, el paso de lavado se realiza mediante filtración de flujo tangencial (TFF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunas modalidades, las células se resuspenden en varios reguladores de pH biocompatibles después del lavado. En ciertas modalidades, se eliminan los componentes de una muestra de células sanguíneas, y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo. En algunas modalidades, los métodos incluyen métodos de separación de células basados en la densidad, tales como la preparación de glóbulos blancos a partir de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y la centrifugación a través de un gradiente de Percoll o Ficoll.

En una modalidad, las células inmunes se obtienen de la sangre circulante de un individuo mediante aféresis o leucoféresis. El producto de la aféresis contiene típicamente linfocitos, que incluyen células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. Las células recolectadas por aféresis pueden lavarse para remover la fracción de plasma y se ponen en un regulador de pH o medio adecuado, tal como solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS) o una solución de lavado que carece de calcio y que puede carecer de magnesio, o puede carecer de muchos o todos los cationes divalentes, para los pasos de procesamiento posteriores. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en varios reguladores de pH biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS libre de Ca y libre de Mg. En forma alternativa, pueden removerse los componentes indeseables de la muestra de aféresis y resuspender las células directamente en medios de cultivo.

En algunas modalidades, los métodos de aislamiento incluyen la separación de diferentes tipos de células con base en la expresión o presencia en la célula de una o más moléculas específicas, tales como marcadores de superficie, por ejemplo, proteínas de superficie, marcadores intracelulares, o ácidos nucleicos. En algunas modalidades, puede usarse cualquier método conocido de separación basado en dichos marcadores. En algunas modalidades, la separación se basa en la afinidad o inmutuafinidad. Por ejemplo, el aislamiento en algunos aspectos incluye la separación de células y poblaciones de células con base en la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, típicamente marcadores de superficie celular, por ejemplo, mediante incubación con un anticuerpo o un miembro de unión que se une específicamente a dichos marcadores, seguido generalmente de lavado y separación de las células que se han unido al anticuerpo o al miembro de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o al miembro de unión.

Dichos pasos de separación pueden basarse en la selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos se conservan para su uso posterior, y/o en la selección negativa, en la que se conservan las células que no se han unido al anticuerpo o al miembro de unión.

En algunos ejemplos, ambas fracciones se conservan para su uso posterior. En algunos aspectos, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no se dispone de un anticuerpo que identifique específicamente un tipo de células en una población heterogénea, de modo que la separación se realiza mejor basándose en los marcadores expresados por células distintas de la población deseada. La separación no necesita dar como resultado un enriquecimiento del 100% o la remoción de una población de células particular o de células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento de células de un tipo particular, tales como las que expresan un marcador, se refiere al aumento del número o porcentaje de dichas células, pero no necesariamente a la ausencia total de células que no expresan el marcador. De igual modo, la selección negativa, la remoción o la depleción de células de un tipo particular, tales como las que expresan un marcador, se refieren a la disminución del número o porcentaje de dichas células, pero no necesariamente implica la remoción completa de todas esas células.

En algunos ejemplos, se llevan a cabo múltiples rondas de pasos de separación, en donde la fracción seleccionada positiva o negativamente en un paso se somete a otro paso de separación, tal como una selección positiva o negativa posterior. En algunos ejemplos, un sólo paso de separación puede agotar las células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, por ejemplo, incubando las células con varios anticuerpos o miembros de unión, cada una específica para un marcador objetivo de la selección negativa. Asimismo, pueden seleccionarse positivamente simultáneamente varios tipos de células, incubando las células con varios anticuerpos o miembros de unión expresados en los varios tipos de células.

En algunas modalidades, una o más poblaciones de células T son enriquecidas o privadas de células que son positivas (marcador+) o que expresan altos niveles (marcador^{alto}) de uno o más marcadores particulares, tales como marcadores de superficie, o que son negativas (marcador-) o que expresan niveles relativamente bajos (marcador^{bajo}) de uno o más marcadores. Por ejemplo, en algunos aspectos, se aíslan subpoblaciones específicas de células T, tales como células positivas o que expresan altos niveles de uno o más marcadores de superficie, por ejemplo, células T CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y/o CD45RO+, mediante técnicas de selección positiva o negativa. En algunos casos, dichos marcadores son aquellos que están ausentes o que se expresan a niveles relativamente bajos en ciertas poblaciones de células T (tales como las células sin memoria), pero están presentes o se expresan a niveles relativamente altos en otras poblaciones de células T (tales como las células de memoria). En una modalidad, las células (tales como las células CD8+ o las células T, por ejemplo, células CD3+) son enriquecidas (es decir, se seleccionan positivamente) con células que son positivas o que expresan altos niveles de superficie de CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD 127 y/o CD62L, y/o privadas (por ejemplo, se seleccionan negativamente) de células que son positivas o que expresan altos niveles de superficie de CD45RA.

En algunas modalidades, las células son enriquecidas o privadas de células positivas o que expresan altos niveles de superficie de CD122, CD95, CD25, CD27 y/o IL7-Ra (CD127). En algunos ejemplos, las células T CD8+ son enriquecidas con células positivas para CD45RO (o negativas para CD45RA) y para CD62L. Por ejemplo, las células T CD3+, CD28+ pueden seleccionarse positivamente usando
 5 perlas magnéticas conjugadas con CD3/CD28 (por ejemplo, usando el expansor de células T CD3/CD28 DYNABEADS® M-450).

En algunas modalidades, las células T se separan de una muestra de PBMCs mediante la selección negativa de marcadores expresados en células no T, tales como células B, monocitos u otros glóbulos blancos, tal como CD14. En algunos aspectos, se usa un paso de selección de CD4+ o
 10 CD8+ para separar las células T CD4+ auxiliares y las células T CD8+ citotóxicas. Dichas poblaciones CD4+ y CD8+ pueden clasificarse después en subpoblaciones mediante selección positiva o negativa de marcadores expresados, o expresados a un grado relativamente mayor, en una o más subpoblaciones de células T sin tratamiento previo, de memoria y/o efectoras. En algunas modalidades, las células CD8+ son enriquecidas o privadas adicionalmente de células madre sin
 15 tratamiento previo, de memoria central, de memoria efectoras y/o de memoria central, por ejemplo, mediante selección positiva o negativa basada en antígenos de superficie asociados a la subpoblación respectiva. En algunas modalidades, el enriquecimiento de células T de memoria central (TCM) se lleva a cabo para aumentar la eficacia, por ejemplo, para mejorar la supervivencia a largo plazo, la expansión y/o el injerto tras la administración, lo cual, en algunos aspectos, es particularmente robusto en dichas
 20 subpoblaciones. En algunas modalidades, la combinación de células T CD8+ y células T CD4+ enriquecidas con TCM, mejora aún más la eficacia.

En algunas modalidades, las células T de memoria están presentes en los subgrupos CD62L+ y CD62L- de los linfocitos CD8+ de sangre periférica. Las PBMCs pueden ser enriquecidas o privadas de las fracciones CD62L-CD8+ y/o CD62L+CD8+, por ejemplo, mediante el uso de
 25 anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L; en algunas modalidades, una población de células T CD4+ y una subpoblación de células T CD8+, por ejemplo, una subpoblación enriquecida con células de memoria central (TCM). En algunas modalidades, el enriquecimiento de células T de memoria central (TCM) se basa en la expresión de superficie positiva o alta de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y/o CD 127; en algunos aspectos, se basa en la selección negativa de células que expresan o expresan en alto
 30 grado CD45RA y/o granzyme B. En algunos aspectos, el aislamiento de una población CD8+ enriquecida con células TCM se lleva a cabo mediante la depleción de células que expresan CD4, CD14 y CD45RA, y la selección positiva o el enriquecimiento de células que expresan CD62L. En un aspecto, el enriquecimiento de células T de memoria central (TCM) se lleva a cabo a partir de una fracción negativa de células seleccionadas con base en la expresión de CD4, que se somete a una selección
 35 negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA, y a una selección positiva basada en CD62L.

Dichas selecciones, en algunos aspectos, se llevan a cabo simultáneamente y, en otros, se llevan a cabo secuencialmente, en cualquier orden. En algunos aspectos, el mismo paso de selección basado en la expresión de CD4 usado para preparar la población o subpoblación de células CD8+, se usa también para generar la población o subpoblación de células CD4+, de modo que las fracciones
 5 positivas y negativas de la separación basada en CD4 se conservan y se usan en pasos posteriores de los métodos, opcionalmente después de uno o más pasos de selección positiva o negativa adicionales.

Las células T CD4+ auxiliares se clasifican en células sin tratamiento previo, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones de células con antígenos de superficie celular. Pueden obtenerse linfocitos CD4+ mediante métodos estándar. En algunas
 10 modalidades, los linfocitos T CD4+ sin tratamiento previo son células T CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ y CD4+. En algunas modalidades, las células CD4+ de memoria central son CD62L+ y CD45RO+. En algunas modalidades, las células CD4+ efectoras son CD62L- y CD45RO. En un ejemplo, para enriquecer con células CD4+ mediante selección negativa, un coctel de anticuerpos monoclonales suele incluir anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En algunas modalidades, el
 15 anticuerpo o el miembro de unión se une a un soporte sólido o matriz, tal como una perla magnética o paramagnética, para permitir la separación de las células para la selección positiva y/o negativa.

En algunas modalidades, las células se incuban y/o se cultivan antes de o en conexión con la ingeniería genética. Los pasos de incubación pueden incluir cultivo, estimulación, activación y/o propagación. En algunas modalidades, las composiciones o células se incuban en presencia de
 20 condiciones estimulantes o un agente estimulador. Dichas condiciones incluyen aquellas diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de las células en la población, para simular la exposición a antígenos y/o para preparar las células para la ingeniería genética, tal como para la introducción de un receptor de antígenos recombinante. Las condiciones pueden incluir uno o más de los siguientes: medios, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de
 25 carbono, tiempo, agentes (por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, miembros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes, y cualquier otro agente diseñado para activar las células. En algunas modalidades, las condiciones o agentes estimuladores incluyen uno o más agentes, por ejemplo, un ligando, capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo de TCR.
 30 En algunos aspectos, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en una célula T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales como los específicos para un componente del TCR y/o un receptor co-estimulador, por ejemplo, anti-CD3 o anti-CD28, unidos a un soporte sólido tal como una perla, y/o una o más citocinas. Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la adición de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 al medio de cultivo (por
 35 ejemplo, a una concentración de por lo menos aproximadamente 0.5 ng/ml). En algunas modalidades,

los agentes estimuladores incluyen IL-2 y/o IL-15, por ejemplo, a una concentración de IL-2 de por lo menos aproximadamente 10 unidades/ml.

En otra modalidad, las células T se aíslan de sangre periférica mediante la lisis de los eritrocitos y la depleción de monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™. Como alternativa, las células T pueden aislarse del cordón umbilical. En cualquier caso, una subpoblación específica de células T puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa.

Las células mononucleares de sangre de cordón umbilical aisladas de esta manera pueden ser depletadas de células que expresan ciertos antígenos que incluyen, pero no están limitados a, CD34, CD8, CD14, CD19 y CD56. La depleción de estas células puede lograrse usando un anticuerpo aislado, una muestra biológica que contenga un anticuerpo, tal como ascitis, un anticuerpo unido a un soporte físico, y un anticuerpo unido a células.

El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa puede lograrse mediante una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie específicos de las células seleccionadas negativamente. Un método preferido es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo, que usa una combinación de anticuerpos monoclonales dirigidos a los marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ mediante selección negativa, una combinación de anticuerpos monoclonales suele incluir anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8.

Para aislar una población de células deseada mediante selección positiva o negativa, puede hacerse variar la concentración de células y de la superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas). En ciertas modalidades, puede ser deseable reducir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (es decir, aumentar la concentración de células) para garantizar el máximo contacto entre ellas. Por ejemplo, en una modalidad, se usa una concentración de 2000 millones de células/ml. En una modalidad, se usa una concentración de 1000 millones de células/ml. En otra modalidad, se usa una concentración de más de 100 millones de células/ml. En otra modalidad, se usa una concentración de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otra modalidad, se usa una concentración de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En otras modalidades, pueden usarse concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede resultar en un aumento de la producción de células, la activación de células y la expansión de células.

Las células T pueden ser también congeladas después del lavado, que no requiere el paso de remoción de monocitos. Sin que se desee que sea limitado por la teoría, la congelación y posterior descongelación provee un producto más uniforme al remover los granulocitos y, en cierta

medida, los monocitos de la población de células. Después del paso de lavado, que remueve el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien se conocen numerosas soluciones y parámetros de congelación en la técnica y serán útiles en este contexto, en un ejemplo no limitativo, un método implica el uso de PBS con DMSO a 20% y albúmina de suero humano a 8%, u otros medios de congelación de células adecuados. Entonces, las células se congelan a -80°C a un régimen de 1°C por minuto, y se almacenan en fase de vapor en un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Pueden usarse otros métodos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediata a -20°C o en nitrógeno líquido.

En una modalidad, la célula T forma parte de una población de células, tales como células mononucleares de sangre periférica, células de sangre de cordón umbilical, una población purificada de células T y una línea de células T. En otra modalidad, la población de células T está compuesta por células mononucleares de sangre periférica. En otra modalidad, la población de células T está compuesta por células T purificadas.

En ciertas modalidades, pueden aislarse células T reguladoras (Tregs) de una muestra. La muestra puede incluir, pero no está limitada a, sangre de cordón umbilical o sangre periférica. En ciertas modalidades, las Tregs se aíslan mediante clasificación por citometría de flujo. La muestra puede ser enriquecida para Tregs antes de su aislamiento mediante cualquier método conocido en la técnica. Las Tregs aisladas pueden ser criopreservadas y/o expandidas antes de su uso. Métodos para aislar Tregs se describen en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7,754,482, 8,722,400 y 9,555,105, y en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 13/639,927, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en la presente.

G. Métodos de tratamiento

Las células inmunes modificadas (por ejemplo, células T) descritas en la presente pueden incluirse en una composición para inmunoterapia. La composición puede incluir una composición farmacéutica y, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica que comprende las células T modificadas.

En un aspecto, la invención incluye un método para tratar una enfermedad o condición en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una célula T modificada de la presente invención. En otro aspecto, la invención incluye un método para tratar una enfermedad o condición en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de una célula T modificada de la presente invención. En otro aspecto, la invención incluye un método para la terapia de transferencia de células adoptiva, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del

mismo una cantidad efectiva de una célula T modificada de la presente invención.

Se conocen métodos para la administración de células inmunes para la terapia celular adoptiva, y pueden usarse en relación con los métodos y composiciones provistos. Por ejemplo, se describen métodos de terapia con células T adoptivas, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de
5 patente de los Estados Unidos No. 2003/0170238 de Gruenberg *et al.*; la patente de los Estados Unidos No. 4,690,915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). Véase, por ejemplo, Themeli *et al.* (2013) Nat Biotechnol. 31(10):928-933; Tsukahara *et al.* (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9; y Davila *et al.* (2013) PLoS ONE 8(4):e61338. En algunas modalidades, la terapia celular, por ejemplo, la terapia adoptiva con células T, se lleva a cabo mediante
10 transferencia autóloga, en donde las células se aíslan y/o se preparan de otra manera a partir del sujeto que recibirá la terapia celular, o de una muestra derivada de dicho sujeto. De esta manera, en algunos aspectos, las células se derivan de un sujeto, por ejemplo, un paciente, que necesita tratamiento, y después del aislamiento y procesamiento, se administran al mismo sujeto.

En algunas modalidades, la terapia celular, por ejemplo, la terapia adoptiva con células
15 T, se lleva a cabo mediante transferencia alogénica, en la que las células se aíslan y/o se preparan de otra manera a partir de un sujeto distinto del que recibirá o que finalmente recibirá la terapia celular, por ejemplo, un primer sujeto. En dichas modalidades, las células se administran entonces a un sujeto diferente, por ejemplo, un segundo sujeto de la misma especie. En algunas modalidades, el primer y el segundo sujeto son genéticamente idénticos. En algunas modalidades, el primer y el segundo sujeto
20 son genéticamente similares. En algunas modalidades, el segundo sujeto expresa la misma clase o supertipo de HLA que el primer sujeto.

En algunas modalidades, el sujeto ha recibido tratamiento con un agente terapéutico dirigido a la enfermedad o condición, por ejemplo, el tumor, antes de la administración de las células o la composición que las contiene. En algunos aspectos, el sujeto presenta resistencia o no responde
25 al otro agente terapéutico. En algunas modalidades, el sujeto presenta una enfermedad persistente o recurrente, por ejemplo, después del tratamiento con otra intervención terapéutica, que incluye quimioterapia, radioterapia y/o trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCTs), por ejemplo, HSCT alogénico. En algunas modalidades, la administración trata efectivamente al sujeto a pesar de que éste se haya vuelto resistente a otra terapia.

En algunas modalidades, el sujeto responde al otro agente terapéutico, y el
30 tratamiento con el agente terapéutico reduce la carga de enfermedad. En algunos aspectos, el sujeto responde inicialmente al agente terapéutico, pero exhibe una recaída de la enfermedad o condición con el tiempo. En algunas modalidades, el sujeto no ha recaído. En algunas de dichas modalidades, se determina que el sujeto tiene riesgo de recaída, por ejemplo, un alto riesgo de recaída, y por lo
35 tanto, las células se administran profilácticamente, por ejemplo, para reducir la probabilidad de recaída

o de prevenirla. En algunos aspectos, el sujeto no ha recibido tratamiento previo con otro agente terapéutico.

En algunas modalidades, el sujeto presenta enfermedad persistente o recurrente, por ejemplo, después del tratamiento con otra intervención terapéutica, que incluye quimioterapia, radioterapia o trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), por ejemplo, HSCT alogénico. En algunas modalidades, la administración trata efectivamente al sujeto a pesar de que este se haya vuelto resistente a otra terapia.

Las células inmunes modificadas de la presente invención pueden administrarse a un animal, de preferencia un mamífero, y aún más preferiblemente un humano, para tratar un cáncer. Además, las células de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de cualquier condición relacionada con el cáncer, especialmente una respuesta inmune mediada por células contra una o más células tumorales, en donde se desee tratar o aliviar la enfermedad. Los tipos de cáncer que se tratarán con las células modificadas o las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen carcinoma, blastoma y sarcoma, así como ciertas leucemias o malignidades linfoides, tumores benignos y malignos, y malignidades tales como sarcomas, carcinomas y melanomas. Otros ejemplos de cánceres incluyen, pero no están limitados a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, etc. Los cánceres pueden ser tumores no sólidos (tales como tumores hematológicos) o tumores sólidos. Se incluyen también tumores/cánceres del adulto y pediátricos. En una modalidad, el cáncer es un tumor sólido o hematológico. En una modalidad, el cáncer es un carcinoma. En una modalidad, el cáncer es un sarcoma. En una modalidad, el cáncer es una leucemia. En una modalidad, el cáncer es un tumor sólido.

Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que generalmente no contienen quistes ni áreas líquidas. Pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos se denominan de acuerdo con el tipo de células que los forman (tales como sarcomas, carcinomas y linfomas). Ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, malignidad linfóide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular,

seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (tales como gliomas del tronco encefálico y gliomas mixtos), glioblastoma (conocido también como glioblastoma multiforme), astrocitomas, linfomas del sistema nervioso central (SNC), germinomas, meduloblastomas, schwannomas, craneofaringiomas, ependimomas, pinealomas, hemangioblastomas, neuromas acústicos, oligodendrogliomas, menangiomas, neuroblastomas, retinoblastomas y metástasis del cerebro. En ciertas modalidades, el cáncer es un astrocitoma. En ciertas modalidades, el cáncer es un astrocitoma de alto grado.

Los carcinomas que pueden ser susceptibles de terapia mediante un método descrito en la presente incluyen, pero no están limitados a, carcinoma esofágico, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células basales (una forma de cáncer de piel), carcinoma de células escamosas (varios tejidos), carcinoma de vejiga, incluyendo el carcinoma de células de transición (una neoplasia maligna de la vejiga), carcinoma broncogénico, carcinoma de colon, carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, carcinoma de pulmón, incluyendo el carcinoma de células pequeñas y el carcinoma de células no pequeñas del pulmón, carcinoma adrenocortical, carcinoma de tiroides, carcinoma pancreático, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de próstata, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma de células renales, carcinoma ductal *in situ* o carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, carcinoma cervical, carcinoma uterino, carcinoma testicular, carcinoma osteogénico, carcinoma epitelial y carcinoma nasofaríngeo.

Los sarcomas que pueden ser susceptibles de terapia mediante un método descrito en la presente incluyen, pero no están limitados a, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, cordoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, sarcoma de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomyosarcoma y otros sarcomas de tejidos blandos.

En ciertos ejemplos de modalidades, las células inmunes modificadas de la invención se usan para tratar un mieloma o una condición relacionada con el mieloma. Ejemplos de mieloma o condiciones relacionadas con el mismo incluyen, pero no están limitados a, mieloma de las cadenas ligeras, mieloma no secretor, gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), plasmocitoma (por ejemplo, solitario, solitario múltiple, extramedular), amiloidosis y mieloma múltiple. En una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar el mieloma múltiple. En una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar el mieloma refractario. En una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar el mieloma recurrente.

En ciertos ejemplos de modalidades, las células inmunes modificadas de la invención se usan para tratar un melanoma o una condición relacionada con el mismo. Ejemplos de melanoma

o condiciones relacionadas con el mismo incluyen, pero no están limitados a, melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral, melanoma amelanótico o melanoma cutáneo (por ejemplo, melanoma cutáneo, ocular, vulvar, vaginal o rectal).

En una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar el melanoma cutáneo. En

- 5 una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar el melanoma refractario. En una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar el melanoma recurrente.

En otros ejemplos de modalidades, las células inmunes modificadas de la invención se usan para tratar un sarcoma o una condición relacionada con el mismo. Ejemplos de sarcoma o condiciones relacionadas con el mismo incluyen, pero no están limitados a, angiosarcoma, 10 condrosarcoma, sarcoma de Ewing, fibrosarcoma, tumor del estroma gastrointestinal, leiomiomasarcoma, liposarcoma, tumor maligno de la vaina nerviosa periférica, osteosarcoma, sarcoma pleomórfico, rabdomiosarcoma y sarcoma sinovial. En una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar el sarcoma sinovial. En una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar liposarcomas, tales como el liposarcoma mixoide/de células redondas, el liposarcoma 15 diferenciado/desdiferenciado y el liposarcoma pleomórfico. En una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar el liposarcoma mixoide/de células redondas. En una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar un sarcoma refractario. En una modalidad, un método de la presente descripción se usa para tratar un sarcoma recurrente.

- 20 Las células de la invención que se administrarán pueden ser autólogas, con respecto al sujeto sometido a terapia.

- La administración de las células de la invención puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente conocida por los expertos en la técnica. Las células de la presente invención pueden administrarse a un sujeto mediante inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en la presente pueden administrarse a un 25 paciente por vía transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.) o intraperitoneal. En otros casos, las células de la invención se inyectan directamente en un sitio de inflamación en el sujeto, un sitio de local, un nódulo linfático, un órgano, un tumor, etc.

- En algunas modalidades, las células se administran a una dosis deseada, que en 30 algunos aspectos incluye la dosis, el número de células o el(los) tipo(s) de célula(s) deseado(s) y/o la relación deseada de tipos de células. De esta manera, la dosis de células en algunas modalidades se basa en el número total de células (o número por kg de peso corporal) y la relación deseada de las poblaciones o subtipos individuales, tales como la relación de CD4+ a CD8+. En algunas modalidades, la dosis de células se basa en el número total deseado (o número por kg de peso corporal) de células 35 en las poblaciones individuales o de los tipos de células individuales. En algunas modalidades, la dosis

se basa en una combinación de dichas características, tales como el número total de células deseado, la relación deseada y el número total deseado de células en las poblaciones individuales.

En algunas modalidades, las poblaciones o sub-tipos de células, tales como las células T CD8+ y CD4+, se administran con una diferencia tolerada de la dosis deseada de células totales, tal como la dosis deseada de células T. En algunos aspectos, la dosis deseada es el número deseado de células o el número deseado de células por unidad de peso corporal del sujeto al que se le administran las células (por ejemplo, células/kg). En algunos aspectos, la dosis deseada es igual o superior al número mínimo de células o al número mínimo de células por unidad de peso corporal. En algunos aspectos, entre las células totales administradas a la dosis deseada, las poblaciones o subtipos individuales están presentes en o cerca de la relación de producción deseada (tal como la relación de CD4+ a CD8+), por ejemplo, con una diferencia o error tolerado en dicha relación.

En algunas modalidades, las células se administran a o dentro de una diferencia tolerada de una dosis deseada de una o más de las poblaciones o subtipos individuales de células, tal como una dosis deseada de células CD4+ y/o una dosis deseada de células CD8+. En algunos aspectos, la dosis deseada es el número deseado de células del subtipo o población, o el número deseado de dichas células por unidad de peso corporal del sujeto al que se administran las células (por ejemplo, células/kg). En algunos aspectos, la dosis deseada es igual o superior al número mínimo de células de la población o subtipo, o al número mínimo de células de la población o subtipo por unidad de peso corporal. De esta manera, en algunas modalidades, la dosis se basa en una dosis fija deseada de células totales y una relación deseada, y/o con base en una dosis fija deseada de uno o más subtipos o subpoblaciones individuales (por ejemplo, cada uno). De esta manera, en algunas modalidades, la dosis se basa en una dosis fija o mínima deseada de células T y una relación deseada de células CD4+ a CD8+, y/o se basa en una dosis fija o mínima deseada de células CD4+ y/o CD8+.

En ciertas modalidades, las células, o poblaciones individuales de subtipos de células, se administran al sujeto a un rango de aproximadamente un millón a aproximadamente 100 mil millones de células, tal como, por ejemplo, 1 millón a aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente mil millones de células, aproximadamente 5 mil millones de células, aproximadamente 20 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 40 mil millones de células, o un rango definido por cualquier par de los valores anteriores), tal como aproximadamente 10 millones a aproximadamente 100 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10 mil millones de células,

aproximadamente 25 mil millones de células, aproximadamente 50 mil millones de células, aproximadamente 75 mil millones de células, aproximadamente 90 mil millones de células, o un rango definido por cualquier par de los valores anteriores), y en algunos casos alrededor de 100 millones de células a alrededor de 50 mil millones de células (por ejemplo, alrededor de 120 millones de células, alrededor de 250 millones de células, alrededor de 350 millones de células, alrededor de 450 millones de células, alrededor de 650 millones de células, alrededor de 800 millones de células, alrededor de 900 millones de células, alrededor de 3 mil millones de células, alrededor de 30 mil millones de células, alrededor de 45 mil millones de células), o cualquier valor entre estos rangos.

En algunas modalidades, la dosis de células totales y/o la dosis de subpoblaciones individuales de células, está dentro de un rango de entre a o aproximadamente 1×10^5 células/kg a aproximadamente 1×10^{11} células/kg y a o aproximadamente 10^{11} células/kilogramo (kg) de peso corporal, tal como entre 10^5 y 10^6 células/kg de peso corporal, por ejemplo, a o aproximadamente 1×10^5 células/kg, 1.5×10^5 células/kg, 2×10^5 células/kg o 1×10^6 células/kg de peso corporal. Por ejemplo, en algunas modalidades, las células se administran a, o dentro de un cierto rango de error de, entre a o aproximadamente 10^4 y a o aproximadamente 10^9 células T/kilogramo (kg) de peso corporal, tal como entre 10^5 y 10^6 células T/kg de peso corporal, por ejemplo, a o aproximadamente 1×10^5 células T/kg, 1.5×10^5 células T/kg, 2×10^5 células T/kg o 1×10^6 células T/kg de peso corporal. En otros ejemplos de modalidades, un rango de dosis adecuado de células modificadas para su uso en un método de la presente descripción incluye, sin limitación, de aproximadamente 1×10^5 células/kg a aproximadamente 1×10^6 células/kg, de aproximadamente 1×10^6 células/kg a aproximadamente 1×10^7 células/kg, de aproximadamente 1×10^7 células/kg a aproximadamente 1×10^8 células/kg, de aproximadamente 1×10^8 células/kg a aproximadamente 1×10^9 células/kg, de aproximadamente 1×10^9 células/kg a aproximadamente 1×10^{10} células/kg, de aproximadamente 1×10^{10} células/kg a aproximadamente 1×10^{11} células/kg. En un ejemplo de modalidad, una dosis adecuada para su uso en un método de la presente descripción es de aproximadamente 1×10^8 células/kg. En un ejemplo de modalidad, una dosis adecuada para su uso en un método de la presente descripción es de aproximadamente 1×10^7 células/kg. En otras modalidades, una dosis adecuada varía de aproximadamente 1×10^7 células totales a aproximadamente 5×10^7 células totales. En algunas modalidades, una dosis adecuada es de aproximadamente 1×10^8 células totales a aproximadamente 5×10^8 células totales. En algunas modalidades, una dosis adecuada es de aproximadamente 1.4×10^7 células totales a aproximadamente 1.1×10^9 células totales. En un ejemplo de modalidad, una dosis adecuada para su uso en un método de la presente descripción es de aproximadamente 7×10^9 células totales.

En algunas modalidades, las células se administran a o dentro de un cierto rango de error de entre a o aproximadamente 10^4 y a o aproximadamente 10^9 células CD4+ y/o CD8+/kilogramo

(kg) de peso corporal, tal como entre 10^5 y 10^6 células CD4+ y/o CD8+/kg de peso corporal, por ejemplo, a o aproximadamente 1×10^5 células CD4+ y/o CD8+/kg, 1.5×10^5 células CD4+ y/o CD8+/kg, 2×10^5 células CD4+ y/o CD8+/kg, o 1×10^6 células CD4+ y/o CD8+/kg de peso corporal. En algunas modalidades, las células se administran a o dentro de un cierto rango de error de, mayor de y/o por lo menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 2.5×10^6 , aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 7.5×10^6 o aproximadamente 9×10^6 células CD4+, y/o por lo menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 2.5×10^6 , aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 7.5×10^6 o aproximadamente 9×10^6 células CD8+, y/o por lo menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 2.5×10^6 , aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 7.5×10^6 o aproximadamente 9×10^6 células T. En algunas modalidades, las células se administran a o dentro de un cierto rango de error de entre aproximadamente 10^8 y 10^{12} o entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} células T, entre aproximadamente 10^8 y 10^{12} o entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} células CD4+, y/o entre aproximadamente 10^8 y 10^{12} o entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} células CD8+.

En algunas modalidades, las células se administran a o dentro de un rango tolerado de una relación de producción deseada de múltiples poblaciones o subtipos de células, tal como células o subtipos CD4+ y CD8+. En algunos aspectos, la relación deseada puede ser una relación específica, o puede ser un rango de relaciones, por ejemplo, en algunas modalidades, la relación deseada (por ejemplo, relación de células CD4+ a CD8+) está entre a o aproximadamente 5:1 y a o aproximadamente 5:1 (o mayor de aproximadamente 1:5 y menos de aproximadamente 5:1), o entre a o aproximadamente 1:3 y a o aproximadamente 3:1 (o mayor de aproximadamente 1:3 y menor de aproximadamente 3:1), tal como entre a o aproximadamente 2:1 y a o aproximadamente 1:5 (o mayor de aproximadamente 1:5 y menor de aproximadamente 2:1, tal como a o aproximadamente 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5 o 1:5. En algunos aspectos, la diferencia tolerada se encuentra dentro de aproximadamente el 1%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50% de la relación deseada, incluyendo cualquier valor entre estos rangos.

En algunas modalidades, se administra una dosis de células modificadas a un sujeto en necesidad de la misma, ya sea en una sola dosis o en múltiples dosis. En algunas modalidades, se administra una dosis de células modificadas en múltiples dosis, por ejemplo, una vez a la semana o cada 7 días, una vez cada 2 semanas o cada 14 días, una vez cada 3 semanas o cada 21 días, o una vez cada 4 semanas o cada 28 días. En un ejemplo de modalidad, se administra una sola dosis de células modificadas a un sujeto en necesidad de la misma. En un ejemplo de modalidad, se administra

una sola dosis de células modificadas a un sujeto en necesidad de la misma mediante infusión intravenosa rápida.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis adecuada puede depender del tipo de enfermedad por tratar, el tipo de células o receptores recombinantes, la severidad y la evolución de la enfermedad, si las células se administran con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del sujeto y su respuesta a las células, y el criterio del médico tratante. En algunas modalidades, las composiciones y las células se administran convenientemente al sujeto de una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

En algunas modalidades, las células se administran como parte de un tratamiento de combinación, tal como de manera simultánea o secuencial, en cualquier orden, con otra intervención terapéutica, tal como un anticuerpo, una célula diseñada, un receptor o un agente, tal como un agente citotóxico o terapéutico. En algunas modalidades, las células se co-administran con uno o más agentes terapéuticos adicionales o en relación con otra intervención terapéutica, ya sea de manera simultánea o secuencial, en cualquier orden. En algunos contextos, las células se co-administran con otra terapia con la suficiente proximidad temporal como para que las poblaciones de células intensifiquen el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunas modalidades, las células se administran antes de los uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas modalidades, las células se administran después de los uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas modalidades, los uno o más agentes adicionales incluyen una citocina, tal como IL-2, por ejemplo, para mejorar la persistencia. En algunas modalidades, los métodos comprenden la administración de un agente quimioterapéutico.

En ciertas modalidades, las células modificadas de la invención (por ejemplo, una célula modificada que comprende un CAR) pueden administrarse a un sujeto en combinación con un inhibidor de un punto de control inmune. Ejemplos de puntos de control inmune incluyen, pero no están limitados a, CTLA-4, PD-1 y TIM-3. Pueden usarse anticuerpos para inhibir un punto de control inmune (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD1, anti-CTLA-4 o anti-TIM-3). Por ejemplo, la célula modificada puede administrarse en combinación con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo dirigido, por ejemplo, a PD-1 (proteína de muerte programada 1). Ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 incluyen, pero no están limitados a, pembrolizumab (KEYTRUDA®, anteriormente lambrolizumab, conocido también como MK-3475) y nivolumab (BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538, OPDIVA®) o un fragmento de unión a antígeno de los mismos. En ciertas modalidades, la célula modificada puede administrarse en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 incluyen, pero no están limitados a, BMS-936559, MPDL3280A (TECENTRIQ®, Atezolizumab) y MEDI4736 (Durvalumab, Imfinzi). En ciertas modalidades, la célula modificada puede administrarse en combinación con un anticuerpo anti-CTLA-

4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Un ejemplo de anticuerpo anti-CTLA-4 incluye, pero no está limitado a, Ipilimumab (nombre comercial Yervoy). Pueden usarse también otros tipos de moduladores de puntos de control inmune que incluyen, pero no están limitados a, pequeñas moléculas, ARNsi, ARNmi y sistemas CRISPR. Los moduladores de puntos de control inmune pueden administrarse antes, después o simultáneamente con la célula modificada que comprende el CAR. En ciertas modalidades, el tratamiento de combinación que comprende un modulador de punto de control inmune puede aumentar la eficacia terapéutica de una terapia que comprende una célula modificada de la presente invención.

Después de la administración de las células, en algunas modalidades, se mide la actividad biológica de las poblaciones de células diseñadas, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos conocidos. Los parámetros por evaluar incluyen la unión específica de una célula T diseñada o natural, u otra célula inmune, al antígeno, *in vivo*, por ejemplo, mediante la formación de imágenes, o *ex vivo*, por ejemplo, mediante ELISA o citometría de flujo. En ciertas modalidades, la capacidad de las células diseñadas para destruir células objetivo puede medirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como las pruebas de citotoxicidad descritas, por ejemplo, en Kochenderfer *et al.*, J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), y Herman *et al.*, J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). En ciertas modalidades, la actividad biológica de las células se mide analizando la expresión y/o secreción de una o más citocinas, tales como CD107a, IFN γ , IL-2 y FNT. En algunos aspectos, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, como la reducción de la carga tumoral.

En ciertas modalidades, se provee al sujeto un tratamiento secundario. Estos tratamientos incluyen, pero no están limitados a, quimioterapia, radioterapia, cirugía y medicamentos.

En algunas modalidades, puede administrarse al sujeto una terapia de acondicionamiento antes de la terapia con células T CAR. En algunas modalidades, la terapia de acondicionamiento comprende la administración de una cantidad efectiva de ciclofosfamida al sujeto. En algunas modalidades, la terapia de acondicionamiento comprende la administración de una cantidad efectiva de fludarabina al sujeto. En modalidades preferidas, la terapia de acondicionamiento comprende la administración de una cantidad efectiva de una combinación de ciclofosfamida y fludarabina al sujeto. La administración de una terapia de acondicionamiento antes de la terapia con células T CAR puede aumentar la eficacia de la terapia con células T CAR. Métodos de acondicionamiento de los pacientes para la terapia con células T se describen en la patente de los Estados Unidos No. 9,855,298, la cual se incorpora en su totalidad en la presente como referencia.

En algunas modalidades, un régimen de dosificación específico de la presente descripción incluye un paso de linfodepleción previo a la administración de las células T modificadas. En un ejemplo de modalidad, el paso de linfodepleción incluye la administración de ciclofosfamida y/o

fludarabina.

En algunas modalidades, el paso de linfodepleción incluye la administración de ciclofosfamida a una dosis de entre aproximadamente 200 mg/m²/día y aproximadamente 2000 mg/m²/día (por ejemplo, 200 mg/m²/día, 300 mg/m²/día o 500 mg/m²/día). En un ejemplo de modalidad, la dosis de ciclofosfamida es de aproximadamente 300 mg/m²/día. En algunas modalidades, el paso de linfodepleción incluye la administración de fludarabina a una dosis de entre aproximadamente 20 mg/m²/día y aproximadamente 900 mg/m²/día (por ejemplo, 20 mg/m²/día, 25 mg/m²/día, 30 mg/m²/día o 60 mg/m²/día). En un ejemplo de modalidad, la dosis de fludarabina es de aproximadamente 30 mg/m²/día.

En algunas modalidades, el paso de linfodepleción incluye la administración de ciclofosfamida a una dosis de entre aproximadamente 200 mg/m²/día y aproximadamente 2000 mg/m²/día (por ejemplo, 200 mg/m²/día, 300 mg/m²/día o 500 mg/m²/día), y fludarabina a una dosis de entre aproximadamente 20 mg/m²/día y aproximadamente 900 mg/m²/día (por ejemplo, 20 mg/m²/día, 25 mg/m²/día, 30 mg/m²/día o 60 mg/m²/día). En un ejemplo de modalidad, el paso de linfodepleción incluye la administración de ciclofosfamida a una dosis de aproximadamente 300 mg/m²/día y fludarabina a una dosis de aproximadamente 30 mg/m²/día.

En un ejemplo de modalidad, la dosis de ciclofosfamida es de 300 mg/m²/día durante tres días, y la dosis de fludarabina es de 30 mg/m²/día durante tres días.

La dosificación de la quimioterapia de linfodepleción puede programarse en los días -6 a -4 (con una ventana de -1 día, es decir, dosificación en los días -7 a -5) en relación con la infusión de células T (por ejemplo, T CAR, T TCR, una célula T modificada, etc.) en el día 0.

En un ejemplo de modalidad, para un sujeto que tiene cáncer, el sujeto recibe quimioterapia de linfodepleción que incluye 300 mg/m² de ciclofosfamida por infusión intravenosa por 3 días antes de la administración de las células T modificadas. En un ejemplo de modalidad, para un sujeto que tiene cáncer, el sujeto recibe quimioterapia de linfodepleción que incluye 300 mg/m² de ciclofosfamida por infusión intravenosa por 3 días antes de la administración de las células T modificadas.

En un ejemplo de modalidad, para un sujeto que tiene cáncer, el sujeto recibe quimioterapia de linfodepleción que incluye fludarabina a una dosis de entre aproximadamente 20 mg/m²/día y aproximadamente 900 mg/m²/día (por ejemplo, 20 mg/m²/día, 25 mg/m²/día, 30 mg/m²/día o 60 mg/m²/día). En un ejemplo de modalidad, para un sujeto que tiene cáncer, el sujeto recibe quimioterapia de linfodepleción que incluye fludarabina a una dosis de 30 mg/m² por 3 días.

En un ejemplo de modalidad, para un sujeto que tiene cáncer, el sujeto recibe quimioterapia de linfodepleción que incluye ciclofosfamida a una dosis de entre aproximadamente 200 mg/m²/día y aproximadamente 2000 mg/m²/día (por ejemplo, 200 mg/m²/día, 300 mg/m²/día o 500

mg/m²/día), y fludarabina a una dosis de entre aproximadamente 20 mg/m²/día y aproximadamente 900 mg/m²/día (por ejemplo, 20 mg/m²/día, 25 mg/m²/día, 30 mg/m²/día o 60 mg/m²/día). En un ejemplo de modalidad, para un sujeto que tiene cáncer, el sujeto recibe quimioterapia de linfodepleción que incluye ciclofosfamida a una dosis de aproximadamente 300 mg/m²/día y fludarabina a una dosis de 30 mg/m² por 3 días.

Las células de la invención pueden administrarse en dosis, vías y horarios que se determinarán en pruebas y experimentos preclínicos y clínicos apropiados. Las composiciones de células pueden administrarse varias veces en dosis dentro de estos rangos. La administración de las células de la invención puede combinarse con otros métodos útiles para tratar la enfermedad o condición deseada, según lo determinen los expertos en la técnica.

Se sabe en la técnica que uno de los efectos adversos tras la infusión de células T CAR es la aparición de una activación inmune, conocida como síndrome de liberación de citocinas (CRS). El CRS es una activación inmune que produce un aumento de las citocinas inflamatorias. El CRS es una toxicidad conocida en el objetivo, cuyo desarrollo probablemente se correlaciona con la eficacia. Las mediciones clínicas y de laboratorio varían de CRS leve (síntomas constitucionales y/o toxicidad de órganos de grado 2) a CRS severo (sCRS; toxicidad de órganos de grado ≥ 3 , intervención clínica agresiva y/o potencialmente mortal). Las características clínicas incluyen fiebre alta, malestar general, fatiga, mialgia, náusea, anorexia, taquicardia/hipotensión, fuga capilar, disfunción cardíaca, insuficiencia renal, insuficiencia hepática y coagulación intravascular diseminada. Se han observado aumentos drásticos de citocinas, tales como interferón gamma, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, IL-10 e IL-6, tras la infusión de células T CAR. Una característica del CRS es la elevación de citocinas, tales como IL-6 (elevación severa), IFN-gamma, FNT-alfa (elevación moderada) e IL-2 (elevación leve). Se ha observado también que las elevaciones en los marcadores de inflamación clínicamente disponibles, tales como la ferritina y la proteína C reactiva (CRP), se correlacionan con el síndrome de CRS. La presencia de CRS se correlaciona generalmente con la expansión y la activación inmune progresiva de las células transferidas adoptivamente. Se ha demostrado que el grado de severidad del CRS depende de la carga de enfermedad en el momento de la infusión, ya que los pacientes con alta carga tumoral presentan más sCRS.

Por consiguiente, la invención provee, después del diagnóstico de CRS, estrategias apropiadas para el manejo del CRS a fin de mitigar los síntomas fisiológicos de la inflamación descontrolada sin reducir la eficacia antitumoral de las células diseñadas (por ejemplo, células T CAR). Las estrategias para el manejo del CRS son conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden administrarse corticosteroides sistémicos para revertir rápidamente los síntomas del sCRS (por ejemplo, CRS de grado 3) sin comprometer la respuesta antitumoral inicial.

En algunas modalidades, puede administrarse un anticuerpo anti-IL-6R. Un ejemplo

de anticuerpo anti-IL-6R es el anticuerpo monoclonal tocilizumab, aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, conocido también como atilizumab (comercializado como Actemra o RoActemra). Tocilizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de interleucina-6 (IL-6R). La administración de tocilizumab ha demostrado una
 5 reversión casi inmediata del CRS.

El tratamiento del CRS se basa generalmente en la severidad del síndrome observado, y las intervenciones se adaptan como tales. Las decisiones sobre el tratamiento del CRS pueden basarse en los signos y síntomas clínicos y la respuesta a las intervenciones, no sólo en los valores de laboratorio.

10 Los casos leves a moderados se tratan generalmente con manejo de los síntomas mediante terapia con fluidos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y antihistamínicos, según sea necesario para un alivio adecuado de los síntomas. Los casos más severos incluyen pacientes con cualquier grado de inestabilidad hemodinámica o con cualquier inestabilidad hemodinámica, y se recomienda la administración de tocilizumab. El tratamiento de primera línea del CRS puede ser
 15 tocilizumab, en algunas modalidades, a la dosis etiquetada de 8 mg/kg IV por 60 minutos (sin exceder los 800 mg/dosis); tocilizumab puede repetirse cada 8 horas. Si la respuesta a la primera dosis de tocilizumab es subóptima, pueden considerarse dosis adicionales. Tocilizumab puede administrarse solo o en combinación con terapia con corticosteroides. Los pacientes con síntomas de CRS persistentes o progresivos, mejoría clínica insuficiente en 12-18 horas, o respuesta deficiente al
 20 tocilizumab, pueden recibir tratamiento con corticosteroides a altas dosis, generalmente hidrocortisona 100 mg IV o metilprednisolona 1-2 mg/kg. A los pacientes con inestabilidad hemodinámica más severa o síntomas respiratorios más severos, se les pueden administrar corticosteroides a altas dosis al inicio del CRS. Las directrices para el manejo del CRS pueden basarse en estándares publicados (Lee *et al.* (2019) Biol Blood Marrow Transplant, doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.758; Neelapu *et al.* (2018) Nat
 25 Rev Clin Oncology, 15:47; Teachey *et al.* (2016) Cancer Discov, 6(6):664-679).

Se han observado características compatibles con el síndrome de activación de macrófagos (MAS) o la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH) en los pacientes tratados usando la terapia con células T CAR (Henter, 2007), que coinciden con las manifestaciones clínicas del CRS. El MAS parece ser una reacción a la activación inmune que se produce a partir del CRS y, por lo tanto,
 30 debe considerarse una manifestación del CRS. El MAS es similar a la HLH (también una reacción a la estimulación inmune). El síndrome clínico del MAS se caracteriza por fiebre alta no remitente, citopenias que afectan por lo menos a dos de tres linajes, y hepatoesplenomegalia. Se asocia con niveles elevados de ferritina en suero, receptor soluble de interleucina-2 y triglicéridos, y una disminución de la actividad de las células asesinas naturales (NK) circulantes.

35 Las células inmunes modificadas que comprenden el CAR de la presente invención

pueden usarse en un método de tratamiento como el descrito en la presente. En un aspecto, la invención incluye un método para tratar el cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrarle cualquiera de las células inmunes o precursoras modificadas descritas en la presente. Otro aspecto de la invención incluye un método para tratar el cáncer en un sujeto en
 5 necesidad del mismo, que comprende administrarle una célula inmune o precursora modificada generada mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente.

Un aspecto de la invención provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo. El método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende
 10 un primer dominio de unión a antígeno capaz de unirse a IL13Ra2; y un segundo receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión a antígeno capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo; y un receptor de tipo II de TGFβ negativo dominante (DN-TGFβRII).

En ciertas modalidades, el primer CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1) o SRNGMS (SEQ ID NO: 12), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3) o TVSSGGSYIYYADSVKVG (SEQ ID NO: 13), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4) o QGTTALATRFFDV (SEQ ID NO: 15); y/o una región variable
 20 de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5) o KASQDVGTAVA (SEQ ID NO: 16), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6) o SASYRST (SEQ ID NO: 17), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7) o QHHYSAPWT (SEQ ID NO: 18).

En ciertas modalidades, el segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNPSLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGFPYW (SEQ ID NO: 27); y/o una región variable de
 30 cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGTLNDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30).

Otro aspecto de la invención provee un método para tratar el glioblastoma en un
 35 sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una

célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8 o 19; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9 o 20; y el segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

Otro aspecto más de la invención incluye un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22; y el segundo CAR comprende un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 34, 44 o 142.

Otro aspecto de la invención provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 56, y el segundo CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 36 o 197.

En ciertas modalidades, el segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 144 o SEQ ID NO: 145; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 147.

En ciertas modalidades, el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

H. Expansión de células inmunes

Ya sea antes o después de la modificación de las células para expresar un CAR, las células pueden activarse y expandirse en número usando métodos como los descritos, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 5 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; y la publicación de los Estados Unidos No. 20060121005. Por ejemplo, las células T de la invención pueden expandirse mediante el contacto con una superficie que tenga unido a la misma un agente que estimule una señal asociada al complejo de CD3/TCR, y un ligando que estimule una molécula co-estimuladora en la superficie de las células T. En particular, las poblaciones de células T pueden estimularse mediante el contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o mediante el contacto con un activador de la proteína cinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la co-estimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, se usa un ligando que se una a dicha molécula. Por ejemplo, las células T pueden ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, bajo condiciones adecuadas para estimular su proliferación. Ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacclone, Besancon, Francia), y estos pueden usarse en la invención, al igual que otros métodos y reactivos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, ten Berge *et al.*, Transplant Proc. (1998) 30(8): 3975-3977; Haanen *et al.*, J. Exp. Med. (1999) 190(9): 1319-1328; y Garland *et al.*, J. Immunol. Methods (1999) 227(1-2): 15 53-63).

Las células T en expansión mediante los métodos descritos en la presente pueden multiplicarse por aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 2000 veces, 3000 veces, 4000 veces, 5000 veces, 6000 25 veces, 7000 veces, 8000 veces, 9000 veces, 10,000 veces, 100,000 veces, 1 millón de veces, 10 millones de veces o más, y cualquiera y todos los números enteros totales o parciales entre los mismos. En una modalidad, las células T se expanden en un rango de aproximadamente 20 veces a aproximadamente 50 veces.

Después del cultivo, las células T pueden incubarse en un medio de células en un aparato de cultivo por un tiempo o hasta que alcancen la confluencia o una alta densidad de células 30 para un paso óptimo, antes de transferirlas a otro aparato de cultivo. El aparato de cultivo puede ser cualquiera de los usados habitualmente para el cultivo de células *in vitro*. De preferencia, el nivel de confluencia es del 70% o más antes de transferir las células a otro aparato de cultivo. Más preferiblemente, el nivel de confluencia es del 90% o más. El tiempo puede ser cualquier tiempo 35 adecuado para el cultivo de células *in vitro*. El medio para las células T puede reemplazarse en cualquier

momento durante el cultivo. De preferencia, el medio se reemplaza aproximadamente cada 2 a 3 días. Entonces, las células T se extraen del aparato de cultivo, después de lo cual pueden usarse inmediatamente o pueden ser criopreservadas para su posterior uso. En una modalidad, la invención incluye la criopreservación de las células T expandidas. Las células T criopreservadas se descongelan antes de introducir los ácidos nucleicos en la célula T.

En otra modalidad, el método comprende el aislamiento y la expansión de las células T. En otra modalidad, la invención comprende además la criopreservación de las células T antes de la expansión. En otra modalidad, las células T criopreservadas se descongelan para su electroporación con el ARN que codifica para la proteína de membrana quimérica.

Otro procedimiento para la expansión de células *ex vivo* se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,199,942 (incorporada en la presente como referencia). La expansión, como se describe en dicha patente, puede ser una alternativa o un complemento a otros métodos de expansión descritos en la presente. En resumen, el cultivo y la expansión *ex vivo* de las células T comprenden la adición de factores de crecimiento de células, tales como los descritos en la patente de los Estados Unidos No. 5,199,942, u otros factores, tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y el ligando c-kit. En una modalidad, la expansión de las células T comprende el cultivo de las células T con un factor seleccionado del grupo que consiste en flt3-L, IL-1, IL-3 y el ligando c-kit.

El paso de cultivo descrito en la presente (contacto con los agentes descritos en la presente o después de la electroporación) puede ser muy breve, por ejemplo, menor de 24 horas, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas. El paso de cultivo descrito con más detalle en la presente (contacto con los agentes descritos en la presente) puede ser más largo, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días.

Se usan varios términos para describir las células en cultivo. El término cultivo de células se refiere generalmente a las células extraídas de un organismo vivo y cultivadas bajo condiciones controladas. Un cultivo de células primario es un cultivo de células, tejidos u órganos extraídos directamente de un organismo, antes del primer subcultivo. Las células se expanden en cultivo cuando se ponen en un medio de crecimiento bajo condiciones que faciliten el crecimiento y/o la división celular, lo que resulta en una mayor población de células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular se mide típicamente con base en el tiempo necesario para que las células dupliquen su número, de otra manera conocido como el tiempo de duplicación.

Cada ronda de subcultivo es referida como pase. Cuando las células se subcultivan, se dice que han sido sometidas a pases. Una población de células específica, o línea de células, a veces se denomina o se caracteriza por el número de pases que ha recibido. Por ejemplo, una población de células cultivada que ha sido sometida a diez pases puede denominarse cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo después del aislamiento de las células del tejido, se denomina P0. Después

del primer subcultivo, las células se describen como cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en el cultivo terciario (P2 o pase 2), y así sucesivamente. Los expertos en la técnica entenderán que puede haber muchas duplicaciones de la población durante el período de pases; por lo tanto, el número de duplicaciones de la población de un cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el período entre pases depende de muchos factores que incluyen, pero no están limitados a, la densidad de siembra, el sustrato, el medio y el tiempo entre los pases.

En una modalidad, las células pueden cultivarse por varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero horario intermedio. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o X-vivo 15 (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, que incluyen suero (por ejemplo, suero de bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-gamma, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF-beta y FNT- α , o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por los expertos en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no están limitados a, agente tensoactivo, plasmanato y agentes reductores tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, X-Vivo 20 y Optimizer, con aminoácidos, piruvato de sodio y vitaminas añadidos, ya sea sin suero o suplementado con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un grupo definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de las células T. Se incluyen antibióticos como la penicilina y la estreptomycin, sólo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infundirán en un sujeto. Las células objetivo se mantienen bajo condiciones necesarias para su crecimiento, por ejemplo, una temperatura (por ejemplo, 37°C) y una atmósfera (por ejemplo, aire más CO₂ a 5%) adecuadas.

El medio usado para el cultivo de las células T puede incluir un agente que pueda co-estimularlas. Por ejemplo, un agente que puede estimular a CD3 es un anticuerpo contra CD3, y un agente que pueda estimular a CD28 es un anticuerpo contra CD28. Una célula aislada mediante los métodos descritos en la presente puede expandirse aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 2000 veces, 3000 veces, 4000 veces, 5000 veces, 6000 veces, 7000 veces, 8000 veces, 9000 veces, 10,000 veces, 100,000 veces, 1 millón de veces, 10 millones de veces, o más. En una modalidad, las células T se expanden en el rango de aproximadamente 20 veces a aproximadamente 50 veces, o más. En una modalidad, las células T reguladoras humanas se expanden usando células que presentan antígenos artificiales (aAPCs) KT64.86 recubiertas con anticuerpos anti-CD3. Métodos para expandir y activar las células T

pueden encontrarse en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7,754,482, 8,722,400 y 9,555,105, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en la presente.

En una modalidad, el método de expansión de células T puede comprender además el aislamiento de las células T expandidas para aplicaciones posteriores. En otra modalidad, el método de expansión puede comprender además una electroporación posterior de las células T expandidas, seguida de cultivo. La electroporación posterior puede incluir la introducción de un ácido nucleico que codifique para un agente, tal como la transducción de las células T expandidas, la transfección de las células T expandidas o la electroporación de las células T expandidas con un ácido nucleico, en la población expandida de células T, en donde el agente estimula aún más a las células T. El agente puede estimular a las células T, por ejemplo, estimulando una mayor expansión, la función efectora, u otra función de las células T.

I. Métodos de producción de células inmunes genéticamente modificadas

La presente descripción provee métodos para producir o generar una célula inmune modificada o un precursor de la misma (por ejemplo, una célula T) de la invención para inmunoterapia tumoral, por ejemplo, inmunoterapia adoptiva.

En algunas modalidades, los CARs se introducen en una célula usando un vector de expresión. Se proveen en la presente vectores de expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para un CAR de la presente invención. Entre los vectores de expresión adecuados se incluyen vectores de lentivirus, vectores de retrovirus gamma, vectores de virus espumosos, vectores de virus adeno-asociados (AAV), vectores de adenovirus, virus híbridos diseñados, ADN desnudo que incluye, pero no está limitado a, vectores mediados por transposones, tales como Sleeping Beauty, Piggybak, e integrasas tales como Phi31. Otros vectores de expresión adecuados incluyen vectores de expresión del virus del herpes simple (HSV) y retrovirus.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico que codifica para un CAR se introduce en la célula mediante transducción viral. En ciertas modalidades, la transducción viral comprende poner en contacto la célula inmune o precursora con un vector viral que comprende el ácido nucleico que codifica para un CAR. En ciertas modalidades, el vector viral es un vector viral adeno-asociado (AAV). En ciertas modalidades, el vector AAV comprende una ITR 5' y una ITR 3' derivada de AAV6. En ciertas modalidades, el vector AAV comprende un elemento regulador post-transcripción del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). En ciertas modalidades, el vector AAV comprende una secuencia de poliadenilación (poliA). En ciertas modalidades, la secuencia de poliA es una secuencia de poliA de la hormona de crecimiento de bovino (BGH).

Los vectores de expresión de adenovirus se basan en adenovirus, que presentan una baja capacidad de integración en el ADN genómico, pero una alta eficiencia para la transfección de

células hospederas. Los vectores de expresión de adenovirus contienen secuencias de adenovirus suficientes para: (a) facilitar el empaquetado del vector de expresión, y (b) expresar finalmente el CAR en la célula hospedera. En algunas modalidades, el genoma del adenovirus es un ADN de doble cadena lineal de 36 kb, en el que puede insertarse una secuencia de ADN extraña (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica para un CAR) para sustituir fragmentos grandes de ADN adenoviral y de esta manera obtener el vector de expresión de la presente invención (véase, por ejemplo, Danthinne e Imperiale, *Gene Therapy* (2000) 7(20): 1707-1714).

Otro vector de expresión se basa en un virus adeno-asociado (AAV), que saca ventaja de los sistemas acoplados a adenovirus. Este vector de expresión de AAV presenta una alta frecuencia de integración en el genoma del hospedero. Puede infectar a células que no se dividen, lo que lo hace útil para el suministro de genes a células de mamífero, por ejemplo, en cultivos de tejidos o *in vivo*. El vector de AAV tiene un amplio rango de hospederos para su infectividad. Detalles sobre la generación y el uso de vectores de AAV se describen en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,139,941 y 4,797,368.

Los vectores de expresión de retrovirus pueden integrarse en el genoma del hospedero, transportar una gran cantidad de material genético extraño, infectar un amplio espectro de especies y tipos de células, y empacarse en líneas de células especiales. El vector retroviral se construye insertando un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que codifique para un CAR) en el genoma viral en puntos específicos para producir un virus con replicación defectuosa. Si bien los vectores retrovirales pueden infectar a una amplia variedad de tipos de células, la integración y la expresión estable del CAR requieren la división de las células hospederas.

Los vectores lentivirales se derivan de lentivirus, que son retrovirus complejos que, además de los genes retrovirales comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,013,516 y 5,994,136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1, VIH-2) y el virus de la inmunodeficiencia simiana (SIV). Los vectores lentivirales se han generado atenuando de forma múltiple los genes de virulencia del VIH; por ejemplo, se deletan los genes env, vif, vpr, vpu y nef, lo que hace que el vector sea biológicamente seguro. Los vectores lentivirales pueden infectar a células que no se dividen, y pueden usarse para la transferencia y expresión génica tanto *in vivo* como *ex vivo*, por ejemplo, de un ácido nucleico que codifica para un CAR (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5,994,136).

Los vectores de expresión que incluyen un ácido nucleico de la presente descripción pueden introducirse en una célula hospedera mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias virales para la transfección, si se desea. En forma alternativa, los vectores de expresión pueden introducirse mediante fusión, electroporación,

biolística, transfección, lipofección, o similares. La célula hospedera puede cultivarse y expandirse en cultivo antes de la introducción de los vectores de expresión, seguido del tratamiento apropiado para su introducción e integración. Posteriormente, las células hospederas se expanden, y pueden analizarse usando un marcador presente en los vectores. Varios marcadores que pueden usarse se conocen en la técnica, y puede incluir hprt, la resistencia a neomicina, la timidina cinasa, la resistencia a higromicina, etc. Como se usa en la presente, los términos "célula", "línea de células" y "cultivo de células" pueden usarse indistintamente. En algunas modalidades, la célula hospedera es una célula inmune o un precursor de la misma, por ejemplo, una célula T, una célula NK o una célula NKT.

La presente invención provee también células genéticamente diseñadas que incluyen y expresan de forma estable un CAR de la presente descripción. En algunas modalidades, las células genéticamente diseñadas son linfocitos T (células T) genéticamente diseñados, células T sin tratamiento previo (TN), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria central [TCM], células de memoria efectoras [TEM]), células asesinas naturales (células NK), y macrófagos capaces de generar una progenie terapéuticamente relevante. En ciertas modalidades, las células genéticamente diseñadas son células autólogas. En ciertas modalidades, la célula modificada es resistente al agotamiento de células T.

Las células modificadas (por ejemplo, que comprenden un CAR) pueden producirse mediante la transfección estable de células hospederas con un vector de expresión que incluya un ácido nucleico de la presente descripción. Otros métodos para generar una célula modificada de la presente descripción incluyen, pero no están limitados a, métodos de transformación química (por ejemplo, usando fosfato de calcio, dendrímeros, liposomas y/o polímeros catiónicos), métodos de transformación no química (por ejemplo, electroporación, transformación óptica, electrotransferencia génica y/o suministro hidrodinámico) y/o métodos basados en partículas (por ejemplo, impalefección, usando una pistola génica y/o magnetofección). Las células transfectadas que expresan un CAR de la presente descripción pueden expandirse *ex vivo*.

Los métodos físicos para introducir un vector de expresión en células hospederas incluyen la precipitación con fosfato de calcio, la lipofección, el bombardeo de partículas, la microinyección, la electroporación, etc. Los métodos para producir células que incluyen vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. Los métodos químicos para introducir un vector de expresión en una célula hospedera incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas.

Los lípidos adecuados para su uso pueden obtenerse de fuentes comerciales. Por

ejemplo, la dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") puede obtenerse de Sigma, St. Louis, MO; el fosfato de dicetilo ("DCP") puede obtenerse de K & K Laboratories (Plainview, NY); el colesterol ("Chol") puede obtenerse de Calbiochem-Behring; el dimiristil fosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos pueden obtenerse de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol pueden almacenarse a aproximadamente -20°C. El cloroformo puede usarse como único solvente, ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos unilamelares y multilamelares formados por la generación de bicapas o agregados lipídicos encerrados. Los liposomas se caracterizan por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa fosfolipídica y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan una auto-reorganización antes de la formación de estructuras cerradas, y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (véase Ghosh *et al.*, 1991 Glycobiology 5: 505-10). Se incluyen también composiciones que presentan estructuras diferentes en solución a la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden adoptar una estructura micelar, o simplemente pueden existir como agregados no uniformes de moléculas lipídicas. Se contemplan también los complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método usado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedera o exponerla al inhibidor de la presente invención, para confirmar la presencia de los ácidos nucleicos en la célula hospedera, pueden realizarse varias pruebas. Dichas pruebas incluyen, por ejemplo, pruebas de biología molecular bien conocidas por los expertos en la técnica, tales como Southern y Northern blotting, RT-PCR y PCR; pruebas bioquímicas, tales como la detección de la presencia o ausencia de un péptido específico, por ejemplo, mediante métodos inmunológicos (ELISA y Western blot) o mediante las pruebas descritas en la presente para identificar agentes que están dentro del alcance de la invención.

En una modalidad, los ácidos nucleicos introducidos en la célula hospedera son ARN. En otra modalidad, el ARN es ARNm que comprende ARN transcrito *in vitro* o ARN sintético. El ARN puede producirse mediante transcripción *in vitro* usando un molde generado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR). El ADN de interés, de cualquier origen, puede convertirse directamente mediante PCR en un molde para la síntesis *in vitro* de ARNm usando cebadores (iniciadores) adecuados y la ARN polimerasa. La fuente de ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN de plásmido, ADN de fagos, ADNc, secuencia de ADN sintético, o cualquier otra fuente de ADN adecuada.

La PCR puede usarse para generar un molde para la transcripción *in vitro* de ARNm, que posteriormente se introduce en las células. Los métodos para realizar la PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores para su uso en la PCR son diseñados para tener regiones sustancialmente

complementarias a las regiones del ADN que se usarán como molde para la PCR. El término "sustancialmente complementarias", como se usa en la presente, se refiere a secuencias de nucleótidos en donde la mayoría o la totalidad de las bases de la secuencia del cebador son complementarias. Las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de unirse o de hibridar con el ADN objetivo

5 previsto bajo las condiciones de unión usadas para la PCR. Los cebadores pueden diseñarse para ser sustancialmente complementarios a cualquier porción del molde de ADN. Por ejemplo, pueden diseñarse para amplificar la porción de un gen que es normalmente transcrito en las células (el marco de lectura abierto), incluyendo las UTRs 5' y 3'. Pueden diseñarse también para amplificar una porción de un gen que codifica para un dominio de interés particular. En una modalidad, los cebadores están

10 diseñados para amplificar la región codificadora de un ADNc humano, que incluye la totalidad o parte de las UTRs 5' y 3'. Los cebadores útiles para la PCR se generan mediante métodos de síntesis bien conocidos en la técnica. Los "cebadores delanteros" son cebadores que contienen una región de nucleótidos sustancialmente complementaria a los nucleótidos del molde de ADN que se encuentran hacia el extremo 5' de la secuencia de ADN que será amplificada. La expresión "hacia el extremo 5'"

15 se usa en la presente para referirse a una ubicación 5' de la secuencia de ADN que será amplificada con respecto a la cadena codificadora. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos sustancialmente complementaria a un molde de ADN de doble cadena que se encuentra hacia el extremo 3' de la secuencia de ADN que será amplificada. La expresión "hacia el extremo 3'" se usa en la presente para referirse a una ubicación 3' de la secuencia de ADN que será

20 amplificada con respecto a la cadena codificadora.

Pueden usarse también estructuras químicas que promuevan la estabilidad y/o la eficiencia de traducción del ARN. El ARN tiene de preferencia UTRs 5' y 3'. En una modalidad, la UTR 5' tiene una longitud de entre cero y 3000 nucleótidos. La longitud de las secuencias de la UTR 5' y 3' que se añadirán a la región codificadora puede modificarse mediante diferentes métodos que incluyen,

25 pero no están limitados a, el diseño de cebadores para PCR que se unen a diferentes regiones de las UTRs. Con este procedimiento, el experto en la técnica puede modificar las longitudes de las UTRs 5' y 3' necesarias para lograr una eficiencia de traducción óptima tras la transfección del ARN transcrito.

Las UTRs 5' y 3' pueden ser las UTRs 5' y 3' endógenas y de ocurrencia natural del gen de interés. En forma alternativa, pueden añadirse secuencias de la UTR no endógenas del gen de

30 interés incorporándolas en los cebadores delantero e inverso o mediante cualquier otra modificación del molde. El uso de secuencias de la UTR no endógenas del gen de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficiencia de traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en las secuencias de la UTR 3' pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, pueden seleccionarse o diseñarse UTRs 3' para aumentar la estabilidad del ARN transcrito con base

35 en propiedades de las UTRs que son bien conocidas en la técnica.

En una modalidad, la UTR 5' puede contener la secuencia de Kozak del gen endógeno. En forma alternativa, cuando se añade una UTR 5' no endógena al gen de interés mediante PCR, como se describió anteriormente, puede rediseñarse una secuencia de Kozak consenso añadiendo la secuencia de la UTR 5'. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficiencia de la traducción de algunos transcritos de ARN, pero no parecen ser necesarias para que todas las moléculas de ARN permitan una traducción eficiente. El requisito de secuencias de Kozak para muchas moléculas de ARNm, es conocido en la técnica. En otras modalidades, la UTR 5' puede derivar de un virus de ARN cuyo genoma de ARN sea estable en las células. En otras modalidades, pueden usarse varios análogos de nucleótidos en la UTR 3' o 5' para impedir la degradación del ARNm por exonucleasas.

Para permitir la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN sin necesidad de clonación génica, debe unirse un promotor de la transcripción al molde de ADN hacia el extremo 5' de la secuencia que será transcrita. Cuando se añade una secuencia que funciona como promotor de una ARN polimerasa al extremo 5' del cebador delantero, el promotor de la ARN polimerasa se incorpora al producto de PCR hacia el extremo 5' del marco de lectura abierto que será transcrito. En una modalidad, el promotor es un promotor de la polimerasa T7, como se describe en otra parte en la presente. Otros promotores útiles incluyen, pero no están limitados a, los promotores de la ARN polimerasa T3 y SP6. Se conocen en la técnica secuencias de nucleótidos consenso para los promotores T7, T3 y SP6.

En una modalidad, el ARNm presenta una caperuza en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el extremo 3', lo que determina la unión a los ribosomas, el inicio de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En un molde de ADN circular, por ejemplo, el ADN de plásmido, la ARN polimerasa produce un producto concatamérico largo, no adecuado para la expresión en células eucarióticas. La transcripción del ADN de plásmido linealizado al final de la UTR 3' da como resultado un ARNm de tamaño normal, que no es efectivo en la transfección eucariótica, incluso si es poliadenilado después de la transcripción.

En un molde de ADN lineal, la ARN polimerasa del fago T7 puede extender el extremo 3' del transcrito más allá de la última base del molde (véase Schenborn y Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003).

El segmento de poliA/T del molde de ADN de la transcripción puede producirse durante la PCR usando un cebador inverso que contenga una cola de poliT, tal como una cola de 100T (de 50 a 5000 T), o después de la PCR mediante cualquier otro método que incluye, pero no está limitado a, la ligación de ADN o la recombinación *in vitro*. Las colas de poli(A) proveen también estabilidad a las moléculas de ARN, y reducen su degradación. Generalmente, la longitud de una cola de poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una modalidad, la cola de poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas.

Las colas de poli(A) de las moléculas de ARN pueden extenderse aún más tras la transcripción *in vitro* con el uso de una polimerasa de poli(A), tal como la polimerasa de poli(A) de *E. coli* (E-PAP). En una modalidad, el aumentar la longitud de una cola de poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos, da como resultado un aumento de aproximadamente 2 veces de la eficiencia de la traducción del ARN. Además, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Dicha unión puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, pueden incorporarse análogos de ATP a la cola de poli(A) usando una polimerasa de poli(A). Los análogos de ATP pueden aumentar aún más la estabilidad del ARN.

Las caperuzas 5' proveen también estabilidad a las moléculas de ARN. En una modalidad preferida, las moléculas de ARN producidas mediante los métodos descritos en la presente incluyen una caperuza 5'. Esta caperuza se provee usando técnicas conocidas en la materia y descritas en la presente (Cougot, *et al.*, Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, *et al.*, RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, *et al.*, Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

En algunas modalidades, el ARN es electroporado en las células, tal como el ARN transcrito *in vitro*. Puede incluirse cualquier soluto adecuado para la electroporación de células, que puede contener factores que faciliten la permeabilidad y la viabilidad celular, tales como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y agentes tensoactivos.

En algunas modalidades, un ácido nucleico que codifica para un CAR de la presente descripción será ARN, por ejemplo, ARN sintetizado *in vitro*. Se conocen en la técnica métodos para la síntesis *in vitro* de ARN; cualquier método conocido puede usarse para sintetizar ARN que comprenda una secuencia que codifique para un CAR. Se conocen en la técnica métodos para introducir ARN en una célula hospedera. Véase, por ejemplo, Zhao *et al.*, Cancer Res. (2010) 15: 9053. La introducción de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un CAR en una célula hospedera puede llevarse a cabo *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, una célula hospedera (por ejemplo, una célula NK, un linfocito T citotóxico, etc.) puede ser electroporada *in vitro* o *ex vivo* con ARN que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique para un CAR.

Los métodos descritos pueden aplicarse a la modulación de la actividad de las células T en la investigación básica y la terapia, en los campos del cáncer, las células madre, las infecciones agudas y crónicas, y las enfermedades autoinmunes, incluyendo la evaluación de la capacidad de la célula T genéticamente modificada para destruir una célula de cáncer objetivo.

Los métodos permiten también controlar el nivel de expresión en un amplio rango modificando, por ejemplo, el promotor o la cantidad de ARN de entrada, lo que permite regular individualmente el nivel de expresión. Además, la técnica de producción de ARNm basada en la PCR facilita enormemente el diseño de moléculas de ARNm con diferentes estructuras y combinaciones de

sus dominios.

Una ventaja de los métodos de transfección de ARN de la invención es que esta es esencialmente transitoria, y no requiere un vector. Puede suministrarse un transgen de ARN a un linfocito, y expresarse en el mismo tras una breve activación de células *in vitro*, como un cassette de expresión mínimo, sin necesidad de secuencias virales adicionales. Bajo estas condiciones, la integración del transgen en el genoma de la célula hospedera es improbable. La clonación de células no es necesaria debido a la eficiencia de la transfección del ARN y a su capacidad para modificar uniformemente toda la población de linfocitos.

La modificación genética de células T con ARN transcrito *in vitro* (ARN-IVT) hace uso de dos estrategias diferentes, ambas probadas sucesivamente en varios modelos animales. Las células se transfectan con ARN transcrito *in vitro* mediante lipofección o electroporación. Es deseable estabilizar el ARN-IVT usando varias modificaciones para lograr una expresión prolongada del ARN-IVT transferido.

Se conocen en la literatura algunos vectores de IVT que se usan de forma estandarizada como molde para la transcripción *in vitro* y que han sido genéticamente modificados para producir transcritos de ARN estabilizados. Los protocolos actuales se basan en un vector de plásmido con la siguiente estructura: un promotor de ARN polimerasa 5' que permite la transcripción de ARN, seguido de un gen de interés flanqueado en 3' y/o 5' por regiones no traducidas (UTR), y un cassette de poliadenilo 3' que contiene entre 50 y 70 nucleótidos A. Antes de la transcripción *in vitro*, el plásmido circular es linealizado hacia el extremo 3' del cassette de poliadenilo por enzimas de restricción de tipo II (la secuencia de reconocimiento corresponde al sitio de escisión). De esta manera, el cassette de poliadenilo corresponde a la secuencia de poli(A) posterior en el transcrito. Como resultado de este procedimiento, algunos nucleótidos permanecen como parte del sitio de escisión enzimática después de la linealización, y extienden o enmascaran la secuencia de poli(A) en el extremo 3'. No está claro si este excedente no fisiológico afecta la cantidad de proteína producida intracelularmente a partir de dicha construcción.

En otro aspecto, la construcción de ARN se suministra en las células mediante electroporación. Véase, por ejemplo, las formulaciones y la metodología de electroporación de construcciones de ácidos nucleicos en células de mamífero, como se describe en los documentos US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1 y US 2004/0092907A1. Los varios parámetros que incluyen la intensidad del campo eléctrico, necesarios para la electroporación de cualquier tipo de células conocido, se conocen generalmente en la literatura de investigación pertinente, así como en numerosas patentes y solicitudes en este campo. Véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos No. 6,678,556, No. 7,171,264 y No. 7,173,116. Están disponibles comercialmente aparatos para la aplicación terapéutica de la electroporación, tal como el

sistema de terapia de electroporación de ADN MedPulser™ (Inovio/Genetronics, San Diego, California), descritos en patentes tales como las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,567,694, 6,516,223, 5,993,434, 6,181,964, 6,241,701 y 6,233,482. La electroporación puede usarse también para la transfección de células *in vitro* como se describe, por ejemplo, en el documento US20070128708A1.

- 5 La electroporación puede usarse también para suministrar ácidos nucleicos en las células *in vitro*. Por consiguiente, la administración de ácidos nucleicos mediada por la electroporación en células, incluyendo las construcciones de expresión, usando cualquiera de los muchos dispositivos y sistemas de electroporación disponibles conocidos por los expertos en la técnica, presenta un nuevo y emocionante medio para suministrar un ARN de interés en una célula objetivo.

10

J. Composiciones y formulaciones farmacéuticas

- Se proveen también poblaciones de células inmunes de la invención, composiciones que contienen dichas células y/o enriquecidas con dichas células, por ejemplo, en las que las células que expresan el CAR representan por lo menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 15 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más del total de células en la composición, o células de un tipo específico, tales como células T o células CD8+ o CD4+. Entre las composiciones se incluyen composiciones y formulaciones farmacéuticas para su administración, tal como para la terapia celular adoptiva. Se proveen también métodos terapéuticos para administrar las células y composiciones a sujetos, por ejemplo, pacientes.

20

- Se proveen también composiciones que incluyen las células para su administración, incluyendo composiciones y formulaciones farmacéuticas, como es el caso de composiciones en forma de dosis unitaria que incluyen el número de células para la administración en una dosis dada o fracción de la misma. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas incluyen generalmente uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales. En algunas modalidades, la 25 composición incluye por lo menos un agente terapéutico adicional.

- El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para el sujeto al que se administraría la formulación. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una 30 formulación farmacéutica, distinto del ingrediente activo, que no es tóxico para el sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no está limitado a, un regulador de pH, un excipiente, un estabilizador o un conservador. En algunos casos, la elección del vehículo depende en parte de la célula específica y/o del método de administración. Por consiguiente, existe una variedad de formulaciones adecuadas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservadores. 35 Entre los conservadores adecuados se incluyen, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato

de sodio y cloruro de benzalconio. En algunos casos, se usa una mezcla de dos o más conservadores. El conservador o mezclas del mismo suelen estar presentes en una cantidad de aproximadamente 0.0001% a aproximadamente 2% en peso de la composición total. Los vehículos se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, decimosexta edición, Osol, A. ed. (1980). Los

5 vehículos farmacéuticamente aceptables suelen ser no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones usadas, e incluyen, pero no están limitados a: reguladores de pH tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como el ácido ascórbico y la metionina; conservadores (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico); alquilparabenos tales como metil- o propil-

10 parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menores de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA;

15 azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o agentes tensoactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG).

En algunos aspectos, las composiciones incluyen agentes reguladores de pH. Entre los agentes reguladores de pH adecuados se incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio,

20 ácido fosfórico, fosfato de potasio y varios otros ácidos y sales. En algunos aspectos, se usa una mezcla de dos o más agentes reguladores de pH. El agente regulador de pH o mezclas del mismo suelen estar presentes en una cantidad de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 4% en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Se describen ejemplos de métodos en más detalle, por ejemplo, en Remington: The Science and

25 Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; vigésima primera ed. (1 de Mayo de 2005).

Las formulaciones pueden incluir soluciones acuosas. La formulación o composición puede contener también más de un ingrediente activo útil para la indicación, enfermedad o condición particular que se trata con las células, de preferencia aquellos con actividades complementarias a las de las células, en donde las actividades respectivas no se afectan negativamente entre sí. Dichos

30 ingredientes activos se presentan convenientemente en combinación en cantidades efectivas para el fin previsto. De esta manera, en algunas modalidades, la composición farmacéutica incluye además otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiaurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina y/o vincristina. En algunas

35 modalidades, la composición farmacéutica contiene las células en cantidades efectivas para tratar o

prevenir la enfermedad o condición, tal como una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva. En algunas modalidades, la eficacia terapéutica o profiláctica se monitorea mediante evaluaciones periódicas de los sujetos tratados. La dosis deseada puede suministrarse mediante una sola administración en bolo de células, mediante múltiples administraciones en bolo de células, o mediante
5 la administración por infusión continua de células.

Las formulaciones incluyen aquellas para la administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o mediante supositorios. En algunas modalidades, las poblaciones de células se administran por vía parenteral. El término "parenteral", como se usa en la presente, incluye la administración intravenosa,
10 intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunas modalidades, las células se administran al sujeto usando la administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. En algunas modalidades, las composiciones se presentan como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas que, en algunos casos, pueden ser reguladas en
15 su pH a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas suelen ser más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Además, las composiciones líquidas son algo más cómodas de administrar, especialmente mediante inyección. Por otra parte, las composiciones viscosas pueden formularse dentro del rango de viscosidad apropiado para proveer períodos de contacto más prolongados con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas
20 pueden incluir vehículos, que pueden ser un solvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina regulada en su pH con fosfato, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de los mismos.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando las células en un solvente, por ejemplo, en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua
25 estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa, o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes reguladores de pH, aditivos gelificantes o que mejoran la viscosidad, conservadores, saborizantes y/o colorantes, de acuerdo con la vía de administración y la preparación deseada. En algunos casos, pueden consultarse textos estándar para preparar preparaciones
30 adecuadas.

Pueden añadirse varios aditivos que mejoran la estabilidad y la esterilidad de las composiciones, que incluyen conservadores antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y reguladores de pH. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse usando
35 varios agentes antibacterianos y antifúngicos, como parabenos, clorobutanol, fenol y ácido sórbico. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante el uso de agentes

que retardan la absorción, como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Las formulaciones que se usarán para la administración *in vivo* suelen ser estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

5 El contenido de los artículos, patentes y solicitudes de patente, así como todos los demás documentos e información electrónicamente disponible mencionados o citados en la presente, se incorporan en su totalidad como referencia, en la misma medida como si cada publicación individual se hubiera indicado específica e individualmente para su incorporación como referencia. Los solicitantes se reservan el derecho de incorporar físicamente a esta solicitud cualquiera y todos los
10 materiales e información de dichos artículos, patentes, solicitudes de patente u otros documentos físicos y electrónicos.

Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a las modalidades específicas de la misma, los expertos en la técnica deben entender que pueden hacerse varios cambios y sustituir equivalentes sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Será fácilmente evidente
15 para los expertos en la técnica que pueden hacerse otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos descritos en la presente, usando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de las modalidades descritas en la presente. Además, pueden hacerse numerosas modificaciones para adaptar una situación, material, composición de materia, procedimiento, paso o pasos del procedimiento, al objetivo, espíritu y alcance de la presente invención. Se pretende que todas estas
20 modificaciones se incluyan dentro del alcance de las reivindicaciones anexas. Habiendo descrito ahora ciertas modalidades en detalle, se entenderán más claramente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen sólo para propósitos de ilustración sin pretender ser limitativos.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

25 La invención se describe ahora haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proveen únicamente con fines ilustrativos, y la invención no se limita a los mismos, sino que abarca más bien todas las variaciones evidentes como resultado de las enseñanzas provistas en la presente.

30

Materiales y métodos

Líneas de células y cultivo de las mismas:

Se derivó la línea GSC humana (5077) de tejido tumoral extirpado obtenido del Comité
35 de Revisión Institucional de la Universidad de Pensilvania con el consentimiento informado por escrito

de los pacientes (Departamento de Neurocirugía, Facultad de Medicina Perelman, Filadelfia, PA). Se mantuvo en DMEM F12 Ham suplementado con penicilina/estreptomicina, GlutaMAX-1, B27 minus A, factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento básico de fibroblastos (Corning, Corning, NY). La línea de células U87MG se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC HTB-14), y se

5 cultivó en MEM que contenía GlutaMAX-1, HEPES, piruvato, penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), y suplementado con suero de bovino fetal (FBS) a 10%. Esta línea de células fue diseñada para expresar la proteína EGFRvIII, la luciferasa verde del escarabajo clic y la proteína verde fluorescente mediante purificación y expansión de células individuales. La línea de células de

10 cáncer de próstata PC3 se obtuvo de la ATCC (CRL-1435), y se cultivó en medio D10 que contenía DMEM suplementado con FBS a 10%, HEPES, penicilina y estreptomicina. Las células de glioma D270 se cultivaron y se hicieron pasar por los flancos de ratones NSG. La línea de células de glioma humano U251 fue provista por el Dr. Jay Dorsey (Departamento de Oncología Radioterapéutica, Universidad de Pensilvania). Las células se analizaron rutinariamente para determinar su identidad y la presencia de contaminación por micoplasmas.

15

Tinción inmunohistoquímica:

La tinción inmunohistoquímica usó un anticuerpo anti-TGF β 1 recombinante (ab215715, Abcam, Waltham, Boston) y DAPI en secciones de tejido derivadas de ratones NSG. A estos ratones se les implantaron intracranealmente gliomas U87 y D270, procedimiento facilitado por

20 Daniel Martínez (Laboratorio Central de Patología del Instituto de Investigación del Hospital Infantil de Filadelfia, Pensilvania). Se usaron secciones de tejido del bazo y la corteza cerebral de los ratones como controles positivo y negativo, respectivamente.

Construcciones de vectores:

25 El CAR 806-Hu07-mCherry se ensambló combinando un scFv dirigido al EGFR (806) y un scFv dirigido a IL13R α 2 (Hu07), que se sintetizaron y ligaron a un vector lentiviral pTRPE con el promotor EF1alfa. La construcción terminó con un mCherry (Twist Bioscience, San Francisco, CA). La estructura dnTGF β RII fue digerida con las enzimas AvrII y SalI, y ligada a la construcción 806-Hu07-mCherry en los mismos sitios enzimáticos, reemplazando el gen mCherry para crear la construcción

30 del CAR 806-Hu07-dnTGF β RII. El CAR-dnTGF β RII-M5 fue un obsequio de Joseph A. Fraietta de la Facultad de Medicina Perelman de la Universidad de Pensilvania. El CAR-CD19 de control fue un obsequio del laboratorio Carl H. June de la Universidad de Pensilvania. Todos los CARs tienen la misma estructura de CAR de segunda generación, salvo los componentes de scFv.

Transducción y cultivo de células T humanas *in vitro*:

Se empacaron lentivirus en células T HEK 293 mediante un procedimiento de genoma dividido, y se titularon usando células SUPT1 de la ATCC (CRL-1942). Se aislaron células T humanas normales de las PBMCs del Centro de Inmunología Humana de la Universidad de Pensilvania, y fueron transducidas usando vectores lentivirales. Las células T fueron estimuladas por 5 días con CD3/CD28 de Dynabeads Human T-Activator (Life Technologies, Carlsbad, CA) a una relación de perlas a células de 3:1. La concentración de células se determinó usando un Coulter Multisizer (Beckman Coulter, Brea, CA), y se mantuvo a 0.7×10^6 células por ml hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 300 fl. Las células se cultivaron en medio R10 (RPMI-1640 suplementado con GlutaMAX-1, HEPES, piruvato, penicilina/estreptomicina y suero de bovino fetal [FBS]) a 10% con 30 UI/ml de rhIL-2 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). Las células T CAR fueron entonces criopreservadas en una mezcla de 90% de FBS y 10% de DMSO para su uso posterior.

TGF- β ELISA:

Las líneas de células tumorales se cultivaron a una densidad de 3×10^6 células por matraz por 3 días. El medio acondicionado se recolectó mediante centrifugación, y se almacenó a -80°C . Se espera que el medio de cultivo con 10% de suero de bovino fetal presente una secreción adicional de TGF- β 1. Por lo tanto, debe usarse un medio de control como blanco, y sustraerlo de las muestras. El medio acondicionado descongelado se procesó con el kit de ELISA para TGF- β 1 (R&D, DY240-05), y las muestras se diluyeron cuatro veces antes de la activación del TGF- β 1 latente en una forma inmunorreactiva.

Prueba de citotoxicidad por bioluminiscencia:

Las células objetivo de luciferasa U87vIII-CBG fueron co-cultivadas con células T efectoras a diferentes relaciones de efector: objetivo por 16 horas, con 20 ng/ml de hTGF- β 1 o medio solo. Antes de medir la luminiscencia, se añadieron 15 μg de D-luciferina (Gold Biotechnology, St. Louis, MO), y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. La luminiscencia se midió usando un lector de microplacas híbrido multimodo BioTek Synergy H4. Al calcular los resultados de la citotoxicidad, se estableció que las células objetivo por sí solas exhibieron 0% de lisis; la lisis máxima se observó en el tratamiento con solución de SDS a 5% (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA).

Prueba de proliferación:

Se sometieron células U87vIII a 10,000 rad de irradiación por 40 minutos. Posteriormente, fueron co-cultivadas por triplicado 0.2×10^6 células tumorales y 1×10^6 células T en placas de 12 cavidades que contenían 4 ml de medio R10, con la adición de 20 ng/ml de TGF- β 1 humano o

medio solo. El medio se reponía si se volvía amarillento alrededor del día 4 o 5. Se recolectaron 1-2 ml de sobrenadante de cada cavidad los días 7, 14 y 21, y se centrifugaron y se almacenaron a -80°C para el posterior análisis de citocinas (Eve Technologies, Calgary, Canadá). Entonces, las células T se resuspendieron, se contaron usando un contador de células Beckman Coulter Multisizer 3, y se transfirieron 1e6 células T a las nuevas 0.2e6 células U87vIII irradiadas para continuar realizando la prueba de proliferación semanalmente; las células T restantes se tiñeron para determinar el fenotipo y la expresión del CAR.

Pruebas de citotoxicidad por impedancia:

Se sembraron 2e5 células tumorales objetivo en placas de 96 cavidades con microelectrodos de Axion Biosystems (Axion Biosystems, Atlanta, GA). Cada placa de impedancia se preparó antes de la experimentación recubriéndola con 20µg/mL de laminina durante la noche a 37°C. Una vez completado el recubrimiento, las cavidades se enjuagaron tres veces con diH₂O, y entonces se cubrieron con 100 µL de medio de cultivo de células. La placa se puso en el analizador ZHT de Axion Biosystems (Axion Biosystems, Atlanta, GA) para registrar las lecturas basales de la impedancia de fondo sin presencia de células. Una vez establecida la línea base, la placa se removió del analizador y se sembró con 5e5 células objetivo en un volumen de 200 µL/cavidad. Tras la siembra de las células, la placa se dejó en la campana de cultivo de células por 1 hora a temperatura ambiente para asegurar la sedimentación y la fijación de las células a los microelectrodos de la superficie inferior. Posteriormente, la placa se regresó al analizador y se inició la recolección de datos. Los datos se recabaron cada minuto por 24 horas para la medición del crecimiento de la monocapa de células. Para la evaluación de la citotoxicidad, el instrumento se pausó a las 24 horas, y el medio se cambió por uno con dosis 1:1 de células efectoras o células T control UTD, o bien medio solo. Los cambios de impedancia se reportaron como el componente resistivo de la impedancia compleja, como se describió previamente. Usando el software AxIS Z (Axion Biosystems, Atlanta, GA), todos los datos se corrigieron para "medio solo" a fin de remover pequeños cambios en la impedancia del medio a lo largo del tiempo y, posteriormente, se normalizaron a la impedancia en el momento de la adición de las células efectoras. Los cálculos del porcentaje de citólisis usan el control sin tratamiento y los controles de lisis completa para determinar el porcentaje de citólisis de las células objetivo, como se indica a continuación:

$$\% \text{ de citólisis}_{\text{muestra}}(t) = \left[\frac{Z_{\text{muestra}}(t) - Z_{\text{lisis completa}}(t)}{Z_{\text{sólo objetivo}}(t) - Z_{\text{lisis completa}}(t)} \right] \times 100\%$$

Citometría de flujo:

Se usó un citómetro de flujo LSRFortessa de 5 láseres para el análisis. Las células se

tiñeron primero con un colorante de viabilidad de células vivas/muertas (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) en PBS. Posteriormente, se tiñeron con los anticuerpos apropiados en regulador de pH de FACS (BSA a 0.5% en PBS) a 4°C por 30 minutos. La expresión del CAR se detectó usando un anticuerpo contra la proteína L biotinilada (GenScript) y PE acoplado a estreptavidina (BD Biosciences).

- 5 El anticuerpo PE anti-receptor II de TGF- β humano (399703) se usó para detectar la expresión de dnTGF β RII en el CAR. La capacidad de fosforilación de SMAD2/3 de las células T CAR se detectó usando anticuerpos BD Phosflow (562586). Se usaron CD69-FITC (clon FN50, BioLegend) y CD25-PerCP/Cyanine5.5 (clon BC96, BioLegend) para detectar la activación de las células T.

10 Prueba de co-cultivo:

- En experimentos de co-cultivo, fueron co-cultivadas células T transducidas o UTD (2e5 células por cavidad en 100 μ L de medio R10) con células objetivo (2e5 células por cavidad en 100 μ L de medio R10) en placas de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 cavidades, a 37°C con CO₂ a 5% por 16 o 20 horas. En la prueba de tinción del marcador PD-1, las células T transducidas o UTD
- 15 se distinguieron mediante tinción de viabilidad de células vivas/muertas (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), seguida de tinción de CD3 humano (clon OKT3, BioLegend, San Diego, CA). Se usó anti-PD-1 humano conjugado con BV711 (clon EH12.2H7, BioLegend, San Diego, CA) para detectar la expresión de PD-1. En la prueba de fenotipo de células T, las células T transducidas o UTD (5e5 células por cavidad en 500 μ L de medio R10) fueron co-cultivadas con células objetivo (2.5e5 células por
- 20 cavidad en 500 μ L de medio R10) en placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 48 cavidades. Las células objetivo se irradiaron con 10,000 rad antes del co-cultivo con células T. En los días 2 y 4, se añadieron 2.5e5 células objetivo irradiadas a cada cavidad. Después de 5 días de co-cultivo, se removieron 500 μ L de sobrenadante de cada cavidad, se resuspendieron con cuidado, y se trasladaron 250 μ L de células a una placa de fondo redondo de 96 cavidades para su tinción. Las células T humanas
- 25 se distinguieron con tinción de viabilidad de células vivas/muertas (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), seguida de tinción de CD3 y CD8 humanos (clon OKT3 y clon SK1, BioLegend, San Diego, CA). Se usaron anticuerpos anti-CD45RA de humano conjugados con BV711 (clon HI100, BioLegend, San Diego, CA) y anti-CCR7 de humano conjugados con APC (clon G043H7, BioLegend, San Diego, CA) para detectar los fenotipos de células T. La tinción se controló adecuadamente con anticuerpos de
- 30 isotipo. Antes y después de cada tinción, las células se lavaron dos veces con PBS con suero de bovino fetal a 2% (regulador de pH de FACS). La fluorescencia se evaluó usando un citómetro de flujo BD LSRFortessa, y los datos se analizaron con el software FlowJo.

Modelos de ratón:

- 35 Todos los experimentos con ratones se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos

aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC). En un modelo de tumor ortotópico, se implantaron intracranealmente 5×10^5 células U87MG-CBG-GFP o 5×10^5 células D270MG-CBG-GFP por vía subcutánea en ratones NSG de 6 a 8 semanas de edad. Los implantes quirúrgicos intracraneales se hicieron mediante un procedimiento estereotáctico con células tumorales implantadas 2 mm a la derecha y 2 mm por delante de la lambda, y 2 mm en el cerebro. En modelos subcutáneos, se inyectaron a los ratones NSG 5×10^5 tumores D270 por vía subcutánea en 100 μ L de PBS en el día 0. La progresión del tumor se evaluó mediante emisión de luminiscencia en un espectro IVIS de Xenogen tras la inyección intraperitoneal de D-luciferina (Gold Biotechnology, St. Louis, MO), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió la longitud y el ancho del tumor subcutáneo con calibradores durante el experimento. El tamaño del tumor se calculó como el área del tumor multiplicando las dos dimensiones. Se inyectaron células T en un volumen total de 100 μ L de PBS por vía intravenosa en la vena de la cola entre 7 y 8 días después de la implantación del tumor. Se hizo un seguimiento de la supervivencia hasta alcanzar un criterio de valoración predeterminado, aprobado por el IACUC.

15

Análisis estadístico:

Los datos se presentan como medias $\pm$ SEM. Los datos de ARN-seq de TCGA se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis. La prueba de proliferación se analizó con la prueba t no pareada. Las pruebas de impedancia y citólisis se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) unidireccional ordinario con la prueba de Tukey para comparar las diferencias en cada grupo. Los experimentos de flujo se analizaron con ANOVA de dos vías con la prueba de Tukey para comparar las diferencias en cada grupo. Las curvas de supervivencia se analizaron con Kaplan-Meier (prueba de rangos logarítmicos). Para el estudio del tumor *in vivo*, se usó regresión lineal para probar las diferencias significativas entre los grupos experimentales. La supervivencia, basada en el tiempo hasta el punto final experimental, se graficó usando una curva de Kaplan-Meier. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism versión 9 (GraphPad, La Jolla, CA).

25

EJEMPLO 1

Células T CAR bicistrónicas blindadas con el receptor II de TGF- β negativo dominante para aliviar la heterogeneidad antigénica y el microambiente inmune supresor en el glioblastoma

30

Las pruebas clínicas con células T CAR para el glioblastoma (GBM) han identificado varios desafíos clave para la eficacia terapéutica, incluyendo el panorama genómico inherentemente heterogéneo y el microambiente tumoral inmunosupresor (TME) encontrado en el GBM. Un estudio

35

previo mostró que las células T CAR monovalentes dirigidas a la variante III del EGFR (EGFRvIII) redujeron las poblaciones de células tumorales positivas para el objetivo, pero la recurrencia tumoral resultó de células tumorales negativas para la objetivo, destacando la limitación de los procedimientos de un sólo objetivo en tumores heterogéneos (O'Rourke *et al.*, (2017). *Sci Transl Med* 9. 10.1126/scitranslmed.aaa0984). Con respecto al TME altamente inmunosupresor en el GBM, el factor de crecimiento transformante- β (TGF β) estuvo presente en el TME del GBM como un impulsor principal de la supresión de la respuesta anti-GBM en muestras clínicas. El TGF β se expresa de forma elevada y constante tanto en las líneas de células tumorales de GBM como en los tejidos tumorales de los pacientes (FIGs. 2A-2D).

Se diseñó una construcción trivalente (CART-EGFR-IL13R α 2-dnTGF β) usando dos construcciones de scFv paralelos que se dirigen independientemente tanto a IL13R α 2 como a EGFRvIII, y un receptor II de TGF β negativo dominante (dn) truncado (FIG. 1, FIGs. 3A-3B). Esta construcción trivalente se diseñó para explorar los posibles efectos aditivos en los sistemas modelo de GBM, tanto *in vitro* como *in vivo*, para limitar el escape tumoral y superar el TME inmunosupresor del GBM. La construcción CART-EGFR-IL13R α 2-dnTGF β amplió el repertorio de células tumorales objetivo, bloqueó la señalización del TGF β (FIG. 3), y sirvió como receptor del TGF β libre en el TME del GBM para superar la función supresora del TGF β .

La construcción tri-modular de células T CAR (es decir, la construcción trivalente (CART-EGFR-IL13R α 2-dnTGF β)) tuvo una respuesta proliferativa mejorada en comparación con la construcción CART-EGFR-IL13R α 2, *in vitro* (FIG. 7). En pruebas de co-cultivo, esta construcción llevó a una expresión reducida de PD-1 (FIG. 5) y un fenotipo efector aumentado (FIGs. 9A-9D), en comparación con la construcción de células T CAR bicistrónica, lo que sugirió una fracción menor de células T agotadas. Las células T CAR tri-modulares bloquearon la vía de señalización supresora de pSmad2/3, lo que llevó a una activación sin impedimentos (FIGs. 6A-6B) y una respuesta proliferativa no inhibida, aunque sin ninguna mejora significativa en la actividad de destrucción tumoral en el co-cultivo a corto plazo (FIGs. 4A-4B). En un modelo de ratón inmunodeficiente, las células T CAR trimodulares erradicaron las células tumorales de manera segura y efectiva, y los ratones tuvieron una supervivencia media más larga en comparación con los tratados con las células CART-EGFR-IL13R α 2 bicistrónicas, que carecían del receptor II de dnTGF β .

Es necesario superar los cambios adaptativos en el TME local y abordar la heterogeneidad antigénica para mejorar la eficacia clínica de las estrategias dirigidas por las células T CAR. El presente trabajo demostró que las construcciones de células T CAR bicistrónicas cooperan con el receptor II de TGF β truncado de manera eficiente. Existen múltiples beneficios al usar el TGF β RII negativo dominante en conjunto con CART-EGFR-IL13R α 2, incluyendo células T CAR que suprimen la señal del TGF β inmunosupresor, presentan una expresión reducida de PD-1 (FIG. 5), presentan una

notable capacidad de proliferación en el modelo de estimulación crónica *in vitro* (FIG. 7), carecen de efectos secundarios *in vivo*, y han mejorado la erradicación de tumores de GBM *in vivo* (FIGs. 10A-10D, FIG. 11). En resumen, la construcción de células T CAR trimodulares, TGFβRII CART-EGFR-IL13Rα2, descrita en la presente, aborda los desafíos clínicos de la heterogeneidad antigénica y el TME inmunosupresor en el GBM.

Modalidades enumeradas

Se proveen las siguientes modalidades enumeradas, cuya numeración no debe interpretarse como una designación de niveles de importancia.

La modalidad 1 provee un ácido nucleico que comprende: a) una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a IL13Rα2 humano, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular; b) una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR que comprende un segundo dominio de unión a antígeno que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, y c) una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGFβ negativo dominante (DN-TGFβRII).

La modalidad 2 provee el ácido nucleico de la modalidad 1, en donde el primer y/o segundo dominio de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un Fab, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) o un anticuerpo de un sólo dominio.

La modalidad 3 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7).

La modalidad 4 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de

aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9.

La modalidad 5 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el primer dominio de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10 u 11.

La modalidad 6 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde la primera secuencia de polinucleótidos codifica para un CAR que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23 o 24.

La modalidad 7 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNPSLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGPYW (SEQ ID NO: 27); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30).

La modalidad 8 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

La modalidad 9 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el segundo dominio de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o 71.

La modalidad 10 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde la segunda secuencia de polinucleótidos codifica para un CAR que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 35 o 75.

La modalidad 11 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde

el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

La modalidad 12 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el ácido nucleico codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 77 o 79.

La modalidad 13 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el dominio de transmembrana se selecciona del grupo que consiste en una secuencia hidrofóbica artificial, y un dominio de transmembrana de una proteína de transmembrana de tipo I, una cadena alfa, beta o zeta de un receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) y CD154, o un dominio de transmembrana derivado de un receptor tipo inmunoglobulina asesina (KIR).

La modalidad 14 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el dominio de transmembrana comprende un dominio de transmembrana de CD8.

La modalidad 15 provee el ácido nucleico de la modalidad 13, en donde el dominio de transmembrana de CD8 es un dominio de transmembrana de CD8 alfa.

La modalidad 16 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el dominio intracelular comprende un dominio de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización intracelular.

La modalidad 17 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el dominio intracelular comprende un dominio co-estimulador de una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteínas de la superfamilia del TNFR, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS, NKG2C y B7-H3 (CD276), o una variante de las mismas, o un dominio intracelular derivado de un receptor tipo inmunoglobulina asesina (KIR).

La modalidad 18 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el dominio intracelular comprende un dominio co-estimulador de 4-1BB.

La modalidad 19 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio intracelular seleccionado del grupo que consiste en dominios de señalización citoplásmica de una cadena CD3 zeta humana (CD3 ζ), Fc γ RIII, Fc ϵ RI, una cola citoplásmica de un receptor de Fc, un receptor citoplásmico inmunorreceptor que posee un motivo de activación basado en tirosina (ITAM), TCR zeta, FcR gamma, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d, o una variante de los mismos.

La modalidad 20 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio intracelular de CD3 ζ .

La modalidad 21 provee un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de

polinucleótidos que codifica para un receptor de antígenos quimérico (CAR) capaz de unirse a IL13R α 2, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, en donde el dominio de unión a antígeno comprende:

5 una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones

10 determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7).

La modalidad 22 provee el ácido nucleico de la modalidad 20, en donde el dominio de

15 unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9.

La modalidad 23 provee el ácido nucleico de la modalidad 20, en donde el dominio de

20 unión a antígeno es un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10 u 11.

La modalidad 24 provee el ácido nucleico de la modalidad 20, en donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23, 24, 42 o 43.

La modalidad 25 provee el ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 20 a 23, en donde el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

La modalidad 26 provee un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une

30 al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII).

La modalidad 27 provee el ácido nucleico de la modalidad 25, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de

35 aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID

NO: 31; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

La modalidad 28 provee el ácido nucleico de la modalidad 25, en donde el dominio de unión a antígeno es un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o 71.

La modalidad 29 provee el ácido nucleico de la modalidad 25, en donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23, 24, 35, 42, 43 o 75.

La modalidad 30 provee el ácido nucleico de la modalidad 25, en donde el DN-TGFβRII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

La modalidad 31 provee el ácido nucleico de la modalidad 26, en donde el ácido nucleico codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 81, 83 u 85.

La modalidad 32 provee un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13Rα2, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un receptor de tipo II de TGFβ negativo dominante (DN-TGFβRII), en donde: el primer CAR comprende un dominio de unión a antígeno que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7), y en donde el segundo CAR comprende un dominio de unión a antígeno que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNP SLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGFPYW (SEQ ID NO: 27); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de

aminoácidos HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30), y en donde el DN-TGFβRII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

La modalidad 33 provee un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13Rα2, una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un DN-TGFβRII, en donde: el primer CAR comprende: una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 44 o 54; y una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 48 o 58; y el segundo CAR comprende: una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 73; y una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 74.

La modalidad 34 provee un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer CAR capaz de unirse a IL13Rα2, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo CAR capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un DN-TGFβRII, en donde: el primer CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 64, 65, 66 o 69; y el segundo CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 70.

La modalidad 35 provee un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica para un primer receptor de antígenos quimérico capaz de unirse a IL13Rα2, una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica para un segundo receptor de antígenos quimérico (CAR) capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo, y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica para un DN-TGFβRII, en donde: la primera secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63; y la segunda secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 34.

La modalidad 36 provee el ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 31 a 33, en donde el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

La modalidad 37 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde
5 la primera secuencia de polinucleótidos y la segunda secuencia de polinucleótidos están separadas por un enlazador.

La modalidad 38 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde la segunda secuencia de polinucleótidos y la tercera secuencia de polinucleótidos están separadas por un enlazador.

10 La modalidad 39 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el ácido nucleico comprende de 5' a 3' la segunda secuencia de polinucleótidos, un enlazador y la primera secuencia de polinucleótidos.

La modalidad 40 provee el ácido nucleico de cualquier modalidad anterior, en donde el ácido nucleico comprende de 5' a 3' la segunda secuencia de polinucleótidos, un enlazador, la
15 primera secuencia de polinucleótidos, un enlazador y la tercera secuencia de polinucleótidos.

La modalidad 41 provee un vector que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las modalidades anteriores.

La modalidad 42 provee el vector de la modalidad 39, en donde el vector es un vector de expresión.

20 La modalidad 43 provee el vector de la modalidad 39 o 40, en donde el vector se selecciona del grupo que consiste en un vector de ADN, un vector de ARN, un plásmido, un vector lentiviral, un vector adenoviral, un vector viral adeno-asociado y un vector retroviral.

La modalidad 44 provee el vector de conformidad con cualquiera de las modalidades 39 a 41, caracterizado además porque comprende adicionalmente un promotor EF-1a.

25 La modalidad 45 provee el vector de conformidad con cualquiera de las modalidades 39 a 42, caracterizado además porque comprende adicionalmente un elemento regulador post-transcripción del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).

La modalidad 46 provee el vector de conformidad con cualquiera de las modalidades 39 a 43, caracterizado además porque comprende adicionalmente un elemento de respuesta rev
30 (RRE).

La modalidad 47 provee el vector de conformidad con cualquiera de las modalidades 39 a 44, caracterizado además porque comprende adicionalmente una secuencia de cPPT.

La modalidad 48 provee el vector de conformidad con cualquiera de las modalidades 39 a 45, en donde el vector es un vector de auto-inactivación.

35 La modalidad 49 provee una célula inmune modificada o una célula precursora de la

misma que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1 a 38, o el vector de conformidad con cualquiera de las modalidades 39 a 46.

La modalidad 50 provee una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende: un primer receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un primer dominio de unión a antígeno capaz de unirse a IL13R α 2; y un segundo receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión a antígeno capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo; y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII).

La modalidad 51 provee una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde: el primer CAR comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1) o SRNGMS (SEQ ID NO: 12), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 3) o TVSSGGSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 13), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4) o QGTTALATRFFDV (SEQ ID NO: 15); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TASLSVSSTYLH (SEQ ID NO: 5) o KASQDVGTAVA (SEQ ID NO: 16), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 6) o SASYRST (SEQ ID NO: 17), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7) o QHHYSAPWT (SEQ ID NO: 18); y el segundo CAR comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNPSLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGFPYW (SEQ ID NO: 27); y una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30).

La modalidad 52 provee una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde: el primer CAR comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%

idéntica a SEQ ID NO: 8 o 19; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9 o 20; y el segundo CAR comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

La modalidad 53 provee una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde: el primer CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10 u 11; y el segundo CAR comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o 71.

La modalidad 54 provee una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde: el primer CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23 o 24; y el segundo CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 35 o 75.

La modalidad 55 provee una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 44 o 54; y una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 48 o 58; y el segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 73; y una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 74.

La modalidad 56 provee una célula inmune modificada o una célula precursora de la

misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13Ra2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGFβ negativo dominante (DN-TGFβRII), en donde el primer CAR comprende un scFv codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 64, 65, 66 o 69; y el segundo CAR comprende un scFv codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 70.

La modalidad 57 provee una célula inmune modificada o una célula precursora de la misma, que comprende un primer CAR capaz de unirse a IL13Ra2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGFβ negativo dominante (DN-TGFβRII), en donde la primera secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63; y la segunda secuencia de polinucleótidos comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 34.

La modalidad 58 provee la célula inmune modificada o una célula precursora de la misma de cualquiera de las modalidades 53 a 55, en donde el DN-TGFβRII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2, o es codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 14.

La modalidad 59 provee la célula modificada de cualquiera de las modalidades 47 a 52, en donde el segundo CAR es capaz de unirse a una isoforma del EGFR seleccionada del grupo que consiste en EGFR de tipo silvestre (wtEGFR), EGFR mutado, EGFR A289V, EGFR A289D, EGFR A289T, EGFR A289T, EGFR R108K, EGFR R108G, EGFR G598V, EGFR D126Y, EGFR C628F, EGFR R108K/A289V, EGFR R108K/D126Y, EGFR A289V/G598V, EGFR A289V/C628F y variante II del EGFR, o cualquier combinación de los mismos.

La modalidad 60 provee la célula modificada de cualquiera de las modalidades 49 a 59, en donde la célula modificada es una célula T modificada.

La modalidad 61 provee la célula modificada de cualquiera de las modalidades 49 a 60, en donde la célula modificada es una célula autóloga.

La modalidad 62 provee la célula modificada de cualquiera de las modalidades 49 a 61, en donde la célula modificada es una célula autóloga obtenida de un sujeto humano.

La modalidad 63 provee la célula modificada de cualquiera de las modalidades 49 a 62, en donde el DN-TGFβRII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

La modalidad 64 provee una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la célula modificada de cualquiera de las modalidades 49 a 63.

La modalidad 65 provee un método para tratar una enfermedad en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la célula modificada de cualquiera de las modalidades 49 a 63, o la composición farmacéutica de la modalidad 64.

5 La modalidad 66 provee el método de la modalidad 65, en donde la enfermedad es un cáncer.

La modalidad 67 provee el método de la modalidad 66, en donde el cáncer es un glioma.

10 La modalidad 68 provee el método de la modalidad 65 o 66, en donde el cáncer es un astrocitoma.

La modalidad 69 provee el método de cualquiera de las modalidades 65 a 68, en donde el cáncer es un astrocitoma de alto grado.

La modalidad 70 provee el método de cualquiera de las modalidades 63 a 67, en donde el cáncer es glioblastoma.

15 La modalidad 71 provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un primer dominio de unión a antígeno capaz de unirse a IL13R α 2; un segundo receptor de antígenos quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión a antígeno capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una isoforma del mismo; y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII).

20

La modalidad 72 provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos TKYGVH (SEQ ID NO: 1) o SRNGMS (SEQ ID NO: 12), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GVKWAGGSTDYNALMS (SEQ ID NO: 3) o TVSSGGSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 13), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos DHRDAMDY (SEQ ID NO: 4) o QGTTALATRFFDV (SEQ ID NO: 15); y el segundo CAR comprende: una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDRs), en donde HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYSITSDFAWN (SEQ ID NO: 25), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGNTRYNP SLK (SEQ ID NO: 26), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VTAGRGFPYW (SEQ ID NO: 27); y una región

25

30

35

variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDRs), en donde LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos HSSQDINSNIG (SEQ ID NO: 28), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos HGTNLDD (SEQ ID NO: 29), y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos VQYAQFPWT (SEQ ID NO: 30).

5 La modalidad 73 provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde: el primer CAR comprende: una región variable de cadena pesada que comprende
10 una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 8 o 19; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 9 o 20; y el segundo CAR comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 31; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 32.

La modalidad 74 provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T
20 modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde: el primer CAR comprende un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22, y el segundo CAR comprende un scFv que comprende
25 una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 33 o 71.

La modalidad 75 provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de
30 unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde: el primer CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43; y el segundo CAR comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 35 o 75.

35 La modalidad 76 provee el método de cualquiera de las modalidades 71 a 75, en

donde el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

La modalidad 77 provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 44 o 54; y una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 48 o 58; y el segundo CAR comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 73; y una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 74.

La modalidad 78 provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende un scFv codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 64, 65, 66 o 69; y el segundo CAR comprende un scFv codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 70.

La modalidad 79 provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende: un primer CAR capaz de unirse a IL13R α 2, un segundo CAR capaz de unirse al EGFR o una isoforma del mismo, y un receptor de tipo II de TGF β negativo dominante (DN-TGF β RII), en donde el primer CAR comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63; y el segundo CAR comprende una secuencia por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 34.

La modalidad 80 provee el método de cualquiera de las modalidades 75 a 77, en donde el DN-TGF β RII comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 2, o es codificado por una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ

ID NO: 14.

La modalidad 81 provee un método para tratar el glioblastoma en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula T modificada que comprende una secuencia de polinucleótidos por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 76 o 78.

Otras modalidades

La mención de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en la presente incluye definiciones de esa variable como cualquier elemento individual o combinación (o subcombinación) de elementos enlistados. La mención de una modalidad en la presente incluye esa modalidad como cualquier modalidad individual o en combinación con cualquier otra modalidad o porción de la misma.

Las descripciones de cada una y cualquier patente, solicitud de patente y publicación citadas en la presente, se incorporan en su totalidad como referencia. Si bien esta invención se ha descrito con referencia a modalidades específicas, es evidente que otros expertos en la técnica pueden idear otras modalidades y variaciones de la misma sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Se pretende que las reivindicaciones anexas sean construidas para incluir la totalidad de dichas modalidades y variaciones equivalentes.