

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 435**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2017 PCT/US2017/062358**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2018 WO18094244**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2017 E 17872043 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2024 EP 3541833**

54 Título: **Conversor de señal de TGF BETA**

30 Prioridad:

**17.11.2016 US 201662423565 P**  
**06.03.2017 US 201762467496 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.08.2024**

73 Titular/es:

**2SEVENTY BIO, INC. (100.0%)**  
**60 Binney Street**  
**Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**BOYERINAS, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 977 435 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Conversor de señal de TGF BETA

5 Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio en virtud de 35 U.S. C. § 119(e) de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/467,496, presentada el 6 de marzo de 2017, y la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/423,565, presentada el 17 de noviembre de 2016.

10

Declaración sobre el listado de secuencias

El Listado de secuencias asociado con esta solicitud se proporciona en formato de texto en lugar de una copia en papel. El nombre del archivo de texto que contiene el Listado de secuencias es BLBD\_080\_02WO\_ST25.txt. El archivo de texto es de 215 KB, se creó el 17 de noviembre de 2017 y se envía electrónicamente a través de EFS-Web, junto con la presentación de la descripción.

15

Antecedentes

20 Campo técnico

La presente descripción se refiere a terapias celulares adoptivas mejoradas. Más particularmente, la descripción se refiere a moléculas de señalización, células y métodos mejorados para usar los mismos.

25 Descripción de la técnica relacionada

La carga global del cáncer se duplicó entre 1975 y 2000. El cáncer es la segunda causa principal de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con aproximadamente 14,1 millones de casos nuevos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer en 2012. Los cánceres más frecuentes son cáncer de mama, cáncer de pulmón y bronquio, cáncer de próstata, cáncer de colon y recto, cáncer de vejiga, melanoma de la piel, linfoma no hodgkiniano, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, renal y pelvis, cáncer de endometrio, leucemia y cáncer de páncreas. Se prevé que el número de nuevos casos de cáncer aumente a 22 millones en las próximas dos décadas.

30

El sistema inmunitario tiene un papel clave en la detección y lucha contra el cáncer humano. La mayoría de las células transformadas son detectadas rápidamente por centinelas inmunitarias y se destruyen mediante la activación de células T específicas de antígeno a través de receptores de células T (TCR) expresados clonalmente. En consecuencia, el cáncer puede considerarse un trastorno inmunológico, un fallo del sistema inmunitario que soporta la respuesta antitumoral necesaria para suprimir y eliminar de forma duradera la enfermedad. Para combatir el cáncer de forma más eficaz, ciertas intervenciones inmunoterapéuticas desarrolladas en las últimas décadas se han centrado específicamente en mejorar la inmunidad de las células T. Estos tratamientos solo han producido casos esporádicos de remisión de la enfermedad y no han tenido un éxito general sustancial. Las terapias más recientes que usan anticuerpos monoclonales que se dirigen a moléculas que inhiben la activación de células T, tales como CTLA-4 o PD-1, han mostrado un efecto antitumoral más sustancial; sin embargo, estos tratamientos también se asocian con una toxicidad sustancial debido a la activación inmunitaria sistémica.

35

40

45

Más recientemente, se han explorado y probado estrategias adoptivas de inmunoterapia celular, que se basan en el aislamiento, modificación, expansión y reinfusión de células T, en ensayos clínicos en etapa temprana. Las células T frecuentemente han sido las células efectoras de elección para la inmunoterapia contra el cáncer debido a su reconocimiento selectivo y sus potentes mecanismos efectoros. Estos tratamientos han mostrado tasas mixtas de éxito, pero un pequeño número de pacientes ha experimentado remisiones duraderas, lo que destaca el potencial aún no obtenido de las inmunoterapias basadas en células T.

50

El reconocimiento satisfactorio de antígenos asociados a células tumorales por células T citolíticas inicia la lisis tumoral dirigida y respalda cualquier enfoque efectivo de inmunoterapia contra el cáncer. Las células T infiltrantes de tumor (TIL) expresan TCR dirigidos específicamente a antígenos asociados a tumores; sin embargo, los números sustanciales de TIL se limitan a solo unos pocos cánceres humanos. Los receptores de células T (TCR) modificados genéticamente y los receptores de antígeno quimérico (CAR) aumentan potencialmente la aplicabilidad de la inmunoterapia basada en células T a muchos cánceres y otros trastornos inmunitarios.

55

Además, las células T modificadas genéticamente de última generación todavía están reguladas por un microentorno tumoral inmunosupresor complejo que consiste en células cancerosas, células inflamatorias, células estromales y citocinas. Entre estos componentes, las células cancerosas, las células inflamatorias y las citocinas supresoras afectan negativamente el fenotipo y la función de las células T. En conjunto, el microentorno tumoral impulsa a las células T a diferenciarse terminalmente en células T agotadas.

60

65

El agotamiento de las células T es un estado de disfunción de las células T en un entorno crónico marcado por el

aumento de la expresión o el aumento de la señalización por los receptores inhibidores; la reducción de la producción de citocinas efectoras; y una disminución de la capacidad de persistir y eliminar el cáncer. Las células T agotadas también muestran pérdida de función de una manera jerárquica: la disminución de la producción de IL-2 y la capacidad de destrucción *ex vivo* se pierden en la etapa temprana del agotamiento, la producción de TNF- $\alpha$  se pierde en la etapa intermedia y la producción de IFN- $\gamma$  y GzmB se pierde en la etapa avanzada del agotamiento. La mayoría de las células T en el microentorno tumoral se diferencian en células T agotadas y pierden la capacidad de eliminar el cáncer y finalmente se eliminan.

El factor de crecimiento transformador beta (TGF $\beta$ ) es una citocina pleiotrópica que se ha implicado como una molécula de señalización inmunosupresora en el microentorno tumoral. El TGF $\beta$  se une a los complejos del receptor de serina/treonina cinasa TGF $\beta$ R1 y TGF $\beta$ R2, lo que da como resultado la fosforilación mediada por el receptor de los factores de transcripción aguas abajo Smad2 y Smad3. Muchos tumores evaden los efectos citostáticos y antiproliferativos de TGF $\beta$  al adquirir mutaciones en los receptores TGF $\beta$ R2 y/o proteínas de señalización Smad aguas abajo. El TGF $\beta$  suprime moléculas clave implicadas en las actividades efectoras y citolíticas de las células T *in vitro*, incluida la secreción de IFN $\gamma$ .

Hasta la fecha, los ensayos clínicos dirigidos a la inhibición de la señalización de TGF $\beta$  mediante el uso de Ab neutralizantes o inhibidores de cinasas han dado resultados decepcionantes y aún no se han informado beneficios terapéuticos significativos.

El documento WO 2016/122738 A1 describe composiciones y métodos para modificar una célula T con un ácido nucleico que codifica una molécula conmutadora que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o fragmento de este y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o fragmento de este.

El documento US 2016/075755 A1 se refiere a métodos y composiciones de terapia celular que utilizan células que expresan al menos un receptor quimérico de TGF $\beta$  que incluye el exodominio de un receptor de TGF $\beta$ II y un endodominio que no es del receptor de TGF $\beta$ , convirtiendo de esta manera la señal negativa de TGF $\beta$  para la proliferación de células T en una señal de activación de células T.

El documento WO 2016/164089 A2 describe complejos polipeptídicos heteroméricos solubles que comprenden un dominio extracelular de un receptor de serina/treonina cinasa de tipo I de la familia TGF-beta y un dominio extracelular de un receptor de serina/treonina cinasa de tipo II de la familia TGF-beta.

El documento WO 2016/006635 A1 presenta, entre otras, moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que comprenden una región Fc de cadena única y los polipéptidos que codifican.

El documento US 2009/222936 A1 se refiere a un polinucleótido recombinante que codifica un poligén que codifica al menos tres polipéptidos.

Breve resumen

La invención se define por las reivindicaciones. La presente descripción generalmente se refiere, en parte, a conversores de señales de TGF $\beta$  mejorados (receptores quiméricos de TGF $\beta$  o CTBR), células genéticamente modificadas, composiciones y métodos para usar los mismos.

En varias modalidades, se contempla un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende: un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana, y un dominio de unión a señales intracelulares de receptor inmunitario; una señal de escisión del polipéptido; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario.

En modalidades adicionales, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido se aísla de un receptor de citocinas, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones o un receptor del tipo toll.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido se aísla de un receptor de citocinas, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones o un receptor de tipo toll.

En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 2 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 1. En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 2. En modalidades particulares, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 1. En modalidades particulares, la proteína de fusión se denomina conversor de señal de CTBR12 o CTBR12.







TLR8. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR8. En algunas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR8. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), la proteína de fusión se denomina conversor de señal de CTBR.TLR8 o CTBR.TLR8.

En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR9 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR9. En modalidades adicionales (no de acuerdo con la invención reivindicada), el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR9. En modalidades adicionales (no de acuerdo con la invención reivindicada), el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR9. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), la proteína de fusión se denomina conversor de señal de CTBR.TLR9 o CTBR.TLR9.

En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR10 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR10. En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR10. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR10. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), la proteína de fusión se denomina conversor de señal de CTBR.TLR10 o CTBR.TLR10.

En modalidades adicionales, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral.

En varias modalidades, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido 2A de autoescisión viral.

En algunas modalidades, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido viral de autoescisión seleccionado del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thosa asigna (TaV) (T2A), un péptido del tescovirus-1 porcino (PTV-1) (P2A), un péptido 2A de Theilovirus y un péptido del virus de la encefalomiocarditis 2A.

En modalidades particulares, un polipéptido de fusión comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de IL-12Rβ2 y un dominio de señalización intracelular de IL-12Rβ2; un péptido 2A de autoescisión viral; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de IL-12Rβ1 y un dominio de señalización intracelular de IL-12Rβ1. En modalidades particulares, la proteína de fusión se denomina conversor de señal de CTBR12 o CTBR12.

En varias modalidades, un polipéptido de fusión comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de IL-12Rβ1 y un dominio de señalización intracelular de IL-12Rβ1; un péptido 2A de autoescisión viral; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de IL-12Rβ2 y un dominio de señalización intracelular de IL-12Rβ2. En modalidades particulares, la proteína de fusión se denomina conversor de señal de CTBR12 o CTBR12.

En modalidades adicionales, un polipéptido de fusión (no de acuerdo con la invención reivindicada) comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de IL-7Rα y un dominio de señalización intracelular de IL-7Rα; un péptido 2A de autoescisión viral; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de IL-2Rγ y un dominio de señalización intracelular de IL-2Rγ. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), la proteína de fusión se denomina conversor de señal de CTBR7 o CTBR7.

En modalidades particulares, un polipéptido de fusión (no de acuerdo con la invención reivindicada) comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de IL-2Rγ y un dominio de señalización intracelular de IL-2Rγ; un péptido 2A de autoescisión viral; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de IL-7Rα y un dominio de señalización intracelular de IL-7Rα. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), la proteína de fusión se denomina conversor de señal de CTBR7 o CTBR7.

En ciertas modalidades, un polipéptido de fusión (no de acuerdo con la invención reivindicada) comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de IL-2Rβ y un dominio de señalización intracelular de IL-2Rβ; un péptido 2A de autoescisión viral; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de IL-2Rγ y un dominio de señalización intracelular de IL-2Rγ. En modalidades particulares (no de





5

10

20

25

35

40

50

60

65

transmembrana de TLR9 y un dominio de señalización intracelular de TLR9; un péptido 2A de autoescisión viral; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de TLR9 y un dominio de señalización intracelular de TLR9. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), la proteína de fusión se denomina CTBR.TLR9 o CTBR. Conversor de señal de TLR9.

En varias modalidades, un polipéptido de fusión (no de acuerdo con la invención reivindicada) comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de TLR10 y un dominio de señalización intracelular de TLR10; un péptido 2A de autoescisión viral; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana de TLR10 y un dominio de señalización intracelular de TLR10. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), la proteína de fusión se denomina conversor de señal de CTBR.TLR10 o CTBR.TLR10.

En algunas modalidades, el polipéptido 2A de autoescisión viral se selecciona del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis equina A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thosa asigna (TaV) (T2A), un péptido de tesovirus-1 porcino (PTV-1) (P2A), un péptido del Teilovirus 2A y un péptido del virus 2A de la encefalomiocarditis.

En modalidades adicionales, un polipéptido de fusión contemplado en la presente descripción comprende además un receptor de antígeno modificado genéticamente y un segundo polipéptido 2A de autoescisión viral.

En ciertas modalidades, el segundo polipéptido 2A de autoescisión viral se selecciona del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thosa asigna (TaV) (T2A), un péptido de Tesovirus-1 porcino (PTV-1) (P2A), un péptido de Teilovirus 2A y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis.

En modalidades particulares, el receptor de antígeno modificado genéticamente se selecciona del grupo que consiste en: un receptor de células T (TCR) modificado genéticamente, un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor DARIC o componentes del mismo, y un receptor de citocinas quiméricas; opcionalmente, en donde el receptor de antígeno modificado genéticamente reconoce un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: receptor de folato alfa, 5T4, αvβ6 integrina, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, fetal AchR, FRα, GD2, GD3, Glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEMs, VEGFR2 y WT-1.

En modalidades adicionales, un polipéptido de fusión comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 26 a 35.

En varias modalidades, se proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión contemplado en la presente descripción.

En modalidades adicionales, se proporciona un vector que comprende un polinucleótido o un polinucleótido de fusión contemplado en la presente descripción.

En modalidades particulares, se proporciona una célula que comprende un polipéptido de fusión, un polinucleótido o un vector contemplado en la presente descripción.

En modalidades adicionales, la célula es una célula hematopoyética.

En ciertas modalidades, la célula es una célula T.

En varias modalidades, la célula es una célula CD3+, CD4+ y/o CD8+.

En algunas modalidades, la célula es una célula efectora inmunitaria.

En modalidades adicionales, la célula es un linfocito T citotóxico (CTL), un linfocito infiltrante de tumor (TIL) o una célula T auxiliar.

En modalidades adicionales, la célula es una célula asesina natural (NK) o una célula T asesina natural (NKT).

En modalidades particulares, la fuente de la célula son las células mononucleares de sangre periférica, la médula ósea, el tejido de los nodos linfáticos, la sangre de cordón, el tejido del timo, el tejido de un sitio de infección, la ascitis, la efusión pleural, el tejido del bazo o los tumores.

En algunas modalidades, una célula que comprende un polipéptido de fusión contemplado en la presente descripción comprende además un receptor de antígenos modificado genéticamente.

5 En varias modalidades, el receptor de antígeno modificado genéticamente se selecciona del grupo que consiste en: un receptor de células T modificado genéticamente (TCR), un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor DARIC o componentes del mismo y un receptor de citocinas quimérico.

10 En modalidades adicionales, se proporciona una composición que comprende un polipéptido de fusión, un polinucleótido, un vector o una célula contemplada en la presente descripción.

En modalidades particulares, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de fusión, un polinucleótido, un vector o una célula contemplada en la presente descripción.

15 Una composición o composición farmacéutica para su uso en un método para tratar a un sujeto que lo necesita en donde el método comprende administrar al sujeto la cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica contemplada en la presente descripción.

20 Una composición o composición farmacéutica para su uso en un método para tratar, prevenir o mejorar al menos un síntoma de un cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria e inmunodeficiencia, o afección asociada con la misma, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición o composición farmacéutica contemplada en la presente descripción.

25 Una composición o composición farmacéutica para su uso en un método para tratar un cáncer sólido en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición o composición farmacéutica.

30 El cáncer sólido comprende cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, sarcoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hueso, cáncer de tiroides, cáncer de riñón o cáncer de piel.

El cáncer sólido es un cáncer de páncreas, un cáncer de pulmón o un cáncer de mama.

35 Se proporciona una composición o composición farmacéutica para su uso en un método para tratar una neoplasia maligna hematológica en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición o composición farmacéutica contemplada en la presente descripción.

La neoplasia maligna hematológica es una leucemia, linfoma o mieloma múltiple.

40 Breve descripción de varias vistas de los dibujos

La Figura 1 muestra un dibujo de polipéptidos que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un receptor negativo dominante de TGF $\beta$  (CAR.DNR); un CAR y una subunidad de TGF $\beta$ R2 (R2); un conversor de señal de CAR y CTBR12 (CAR.CTBR12), y un conversor de señal de CAR y CTBR7 (CAR.CTBR7).

45 La Figura 2 muestra la expresión de CAR y la subunidad de TGF $\beta$ R2 en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGF $\beta$  DNR, la subunidad de TGF $\beta$ R2 y el conversor de señal de CTBR12.

La Figura 3 muestra la expresión de fosfo-SMAD2/3 en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGF $\beta$  DNR, la subunidad de TGF $\beta$ R2 y el conversor de señal de CTBR12 y tratadas con TGF $\beta$ 1 en comparación con células no tratadas.

50 La Figura 4 muestra la expresión de fosfo-STAT4 en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGF $\beta$  DNR, la subunidad de TGF $\beta$ R2 y el conversor de señal de CTBR12 y tratadas ya sea con IL-12 (hilera superior) o TGF $\beta$ 1 (hilera inferior).

55 La Figura 5 muestra la expresión de fosfo-STAT4 y fosfo-STAT3 en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 y el conversor de señal de CTBR12 y tratadas con IL-12 (panel izquierdo) o TGF $\beta$ 1 (panel derecho).

La Figura 6 muestra el análisis de la expresión génica de células T humanas primarias transducidas con CAR anti-ROR1 en combinación con el conversor de señal de CTBR12 reestimulado en serie con células diana que expresan ROR1 durante 21 días en presencia o ausencia de TGF $\beta$ 1.

60 La Figura 7 muestra la secreción de IFN $\gamma$  de células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGF $\beta$  DNR o el conversor de señal de CTBR12 y cultivadas en presencia o ausencia de TGF $\beta$ 1 en placas recubiertas con CD3 o ROR1.

La Figura 8 muestra las curvas de crecimiento para las células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGF $\beta$  DNR o el conversor de señal de CTBR12 reestimulado en serie con células diana que expresan ROR1 en presencia o ausencia de TGF $\beta$ 1.

65 La Figura 9 muestra la expresión de las subunidades de CAR y TGF $\beta$ R2 en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGF $\beta$  DNR y el conversor de señal de CTBR7.

La Figura 10 muestra la expresión de fosfo-SMAD2/3 en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGFβ DNR, y el conversor de señal de CTBR7 y tratadas con TGFβ1.

La Figura 11 muestra la expresión de fosfo-STATs en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGFβ DNR, y el conversor de señal de CTBR7 y tratadas con TGFβ1.

La Figura 12 muestra la expresión de BCL2 en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGFβ DNR, y el conversor de señal de CTBR7 y tratadas con TGFβ1.

La Figura 13 muestra las curvas de crecimiento para las células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGFβ DNR o el conversor de señal de CTBR7 en presencia o ausencia de TGFβ1.

La Figura 14 muestra las curvas de crecimiento para las células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-ROR1 solo y en combinación con el TGFβ DNR o el conversor de señal de CTBR7 reestimulado en serie con células diana que expresan ROR1 en presencia o ausencia de TGFβ1.

La Figura 15 muestra la expresión de la subunidad de CAR y TGFβR2 en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-EGFR solo y en combinación con el TGFβ DNR, el conversor de señal de CTBR12 y el conversor de señal de CTBR7 (panel superior). La Figura 15 también muestra la expresión de fosfo-SMAD2/3 en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-EGFR solo y en combinación con el TGFβ DNR, el conversor de señal de CTBR12 y el conversor de señal de CTBR7 y tratadas con TGFβ1 (panel inferior) en comparación con células no tratadas.

La Figura 16 muestra la expresión de fosfo-STAT4 en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-EGFR solo y en combinación con el TGFβ DNR, y el conversor de señal de CTBR12 y tratadas ya sea con IL-12 o TGFβ1.

La Figura 17 muestra la expresión de fosfo-STATs en células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-EGFR solo y en combinación con el TGFβ DNR, y el conversor de señal de CTBR7 y tratadas con IL-7 o TGFβ1.

La Figura 18 muestra la secreción de IFNγ de células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-EGFR solo y en combinación con el TGFβ DNR o el conversor de señal de CTBR12 y cultivadas con líneas celulares EGFR (-) o EGFR (+) en presencia o ausencia de TGFβ1.

La Figura 19 muestra las curvas de crecimiento para las células T humanas primarias transducidas con un CAR anti-EGFR solo y en combinación con el TGFβ DNR, el conversor de señal de CTBR12 o el conversor de señal de CTBR7 reestimulado en serie con células diana que expresan EGFR en presencia o ausencia de TGFβ1.

La Figura 20 muestra un dibujo de polipéptidos que codifican un receptor de células T (TCR) que reconoce NY-ESO1 (A2), un NY-ESO1 TCR y un receptor negativo dominante de TGFβ (NY-ESO1.DNR); un conversor de señal de NY-ESO1 TCR y CTBR7 (NY-ESO1.CTBR7), y un conversor de señal de NY-ESO1 TCR y CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12).

La Figura 21 muestra la expresión de fosfo-SMAD2/3 en células T humanas primarias transducidas con un NY-ESO1 TCR, NY-ESO1.DNR, NY-ESO1.CTBR7 y NY-ESO1.CTBR12 y tratadas con TGFβ1 en comparación con células no tratadas.

La Figura 22 muestra la expresión de fosfo-STATs en células T humanas primarias transducidas con un NY-ESO1.CTBR7 y tratadas con IL-7 o TGFβ1 (panel superior). La Figura 22 también muestra la expresión de fosfo-STAT4 en células T humanas primarias transducidas con un NY-ESO1.CTBR12 y tratadas con IL-12 o TGFβ1 (panel inferior).

La Figura 23 muestra la secreción de IFNγ de células T humanas primarias transducidas con un NY-ESO1 TCR, NY-ESO1.DNR, NY-ESO1.CTBR7 y NY-ESO1.CTBR12 cultivado con líneas celulares A2(+).NY-ESO1(+) en presencia o ausencia de TGFβ1.

#### Breve descripción de los identificadores de secuencia

La SEQ ID NO: 1 expone la secuencia polipeptídica de TGFβR1 humano.

La SEQ ID NO: 2 expone la secuencia polipeptídica de TGFβR2 humano.

La SEQ ID NO: 3 expone la secuencia polipeptídica de IL-12Rβ1 humano (CD212).

La SEQ ID NO: 4 expone la secuencia polipeptídica de IL-12Rβ2 humano.

La SEQ ID NO: 5 expone la secuencia polipeptídica de IL-7Rα humano (CD127).

La SEQ ID NO: 6 expone la secuencia polipeptídica de IL-2Rγ humano (CD 132).

La SEQ ID NO: 7 expone la secuencia polipeptídica de IL-2Rβ humano (CD122).

La SEQ ID NO: 8 expone la secuencia polipeptídica de IL-21R humano (CD360).

La SEQ ID NO: 9 expone la secuencia polipeptídica de IL-18R1 humano (CD218a).

La SEQ ID NO: 10 expone la secuencia polipeptídica de IL-18RAP humano (CD218b).

La SEQ ID NO: 11 expone la secuencia polipeptídica de IL-1R1 humano (CD121a).

La SEQ ID NO: 12 expone la secuencia polipeptídica de IL-1RAP humano.

La SEQ ID NO: 13 expone la secuencia polipeptídica de IFNAR1 humano.

La SEQ ID NO: 14 expone la secuencia polipeptídica de IFNAR2 humano.

La SEQ ID NO: 15 expone la secuencia polipeptídica de IL-1RL2 humano.

La SEQ ID NO: 16 expone la secuencia polipeptídica de TLR1 humano (CD281).

La SEQ ID NO: 17 expone la secuencia polipeptídica de TLR2 humano (CD282).

La SEQ ID NO: 18 expone la secuencia polipeptídica de TLR3 humano (CD283).

La SEQ ID NO: 19 expone la secuencia polipeptídica de TLR4 humano (CD284).

La SEQ ID NO: 20 expone la secuencia polipeptídica de TLR5 humano (CD285).

- La SEQ ID NO: 21 expone la secuencia polipeptídica de TLR6 humano (CD286).  
 La SEQ ID NO: 22 expone la secuencia polipeptídica de TLR7 humano (CD287).  
 La SEQ ID NO: 23 expone la secuencia polipeptídica de TLR8 humano (CD288).  
 La SEQ ID NO: 24 expone la secuencia polipeptídica de TLR9 humano (CD289).  
 La SEQ ID NO: 25 expone la secuencia polipeptídica de TLR10 humano (CD290).  
 La SEQ ID NO: 26 expone la secuencia polipeptídica de una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de TGFβR1 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-12Rβ1 humano.  
 La SEQ ID NO: 27 expone la secuencia polipeptídica de una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de TGFβR2 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-12Rβ2 humano.  
 La SEQ ID NO: 28 expone la secuencia polipeptídica de una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de TGFβR2 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-12Rβ2 humano, una secuencia de escisión polipeptídica y el dominio extracelular de TGFβR1 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-12Rβ1 humano. La SEQ ID NO: 29 expone la secuencia polipeptídica de una proteína de fusión que comprende un receptor de antígeno quimérico, una secuencia de escisión polipeptídica, el dominio extracelular de TGFβR2 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-12Rβ2 humano, una secuencia de escisión polipeptídica y el dominio extracelular de TGFβR1 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-12Rβ1 humano.  
 La SEQ ID NO: 30 expone la secuencia polipeptídica de una proteína de fusión que comprende un receptor de antígeno quimérico, una secuencia de escisión polipeptídica, el dominio extracelular de TGFβR2 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-12Rβ2 humano, una secuencia de escisión polipeptídica y el dominio extracelular de TGFβR1 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-12Rβ1 humano. X representa cualquier secuencia de scFv.  
 La SEQ ID NO: 31 expone la secuencia polipeptídica de una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de TGFβR1 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-2Ry humano.  
 La SEQ ID NO: 32 expone la secuencia polipeptídica de una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de TGFβR2 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-7Rα humano.  
 La SEQ ID NO: 33 expone la secuencia polipeptídica de una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de TGFβR2 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-7Rα humano, una secuencia de escisión polipeptídica y el dominio extracelular de TGFβR1 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-2Ry humano.  
 La SEQ ID NO: 34 expone la secuencia polipeptídica de una proteína de fusión que comprende un receptor de antígeno quimérico, una secuencia de escisión polipeptídica, el dominio extracelular de TGFβR2 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-7Rα humano, una secuencia de escisión polipeptídica y el dominio extracelular de TGFβR1 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-2Ry humano.  
 La SEQ ID NO: 35 expone la secuencia polipeptídica de una proteína de fusión que comprende un receptor de antígeno quimérico, una secuencia de escisión polipeptídica, el dominio extracelular de TGFβR2 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-7Rα humano, una secuencia de escisión polipeptídica y el dominio extracelular de TGFβR1 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-2Ry humano.  
 Las SEQ ID NO: 36-46 exponen las secuencias de aminoácidos de varios enlazadores.  
 Las SEQ ID NO: 47-71 exponen las secuencias de aminoácidos de los sitios de escisión de proteasas y los sitios de escisión de polipéptidos de autoescisión.

#### Descripción detallada

#### A. Descripción general

Las células T que expresan receptor de antígeno quimérico (células T CAR) han demostrado una actividad antitumoral significativa en neoplasias hematológicas. Sin embargo, la actividad en las indicaciones de tumores sólidos se ha limitado en parte debido al microentorno inmunosupresor de tumores sólidos (EMT). La sobreproducción de citocinas inmunosupresoras, incluido TGFβ, por las células tumorales y los linfocitos infiltrantes de tumores contribuye a un microentorno tumoral inmunosupresor. El TGFβ inhibe la función de las células T a través de una variedad de mecanismos. La TGFβ se asocia con frecuencia a metástasis tumorales e invasión, lo que inhibe la función de las células inmunitarias y mal pronóstico en pacientes con cáncer. La señalización de TGFβ a través de TGFβR2 en los CTL específicos del tumor amortigua su función y frecuencia en el tumor, y el bloqueo de la señalización de TGFβ en las células T CD8<sup>+</sup> con anticuerpos monoclonales da como resultado una vigilancia tumoral más rápida y la presencia de muchos más CTL en el sitio del tumor. Hasta la fecha, las estrategias para inhibir TGFβ en un entorno clínico no han dado lugar a beneficios terapéuticos significativos.

La presente descripción generalmente se refiere a polipéptidos que convierten una señal de TGFβ inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora y a células que expresan los polipéptidos. Sin desear unirse a ninguna teoría particular, los polipéptidos contemplados en la presente descripción son conversores de señal de TGFβ que comprenden los dominios de TGFβR1 y TGFβR2 de unión a TGFβ, que cuando se unen a endodominios inmunoestimuladores y se coexpresan en células efectoras inmunitarias, pueden convertir la exposición a TGFβ de una señal inmunosupresora a una inmunoestimuladora que estimula la actividad y función de las células efectoras inmunitarias. La coexpresión de polipéptidos conversores de señal de TGFβ en células efectoras inmunitarias hace que las células sean resistentes a los impactos inmunosupresores de TGFβ, por ejemplo, al restaurar o aumentar la

secreción de citocinas proinflamatorias. En modalidades preferidas en particular, el polipéptido conversor de señal TGFβ se denomina receptor quimérico de TGFβ o CTBR.

En varias modalidades, la presente descripción contempla, en parte, polipéptidos que convierten una señal de TGFβ inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada a través de o por uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores inmunitarios.

En varias modalidades, la presente descripción contempla, en parte, polipéptidos que convierten una señal de TGFβ inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada a través de o por uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores de citocinas.

En varias modalidades, la presente descripción contempla, en parte, polipéptidos que convierten una señal de TGFβ inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada a través de o por uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores de interleucina.

En varias modalidades, la presente descripción contempla, en parte, polipéptidos que convierten una señal de TGFβ inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada a través de o por uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores de reconocimiento de patrones.

En varias modalidades, la presente descripción contempla, en parte, polipéptidos que convierten una señal de TGFβ inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada a través de o por uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores de tipo toll.

En modalidades particulares, la presente descripción contempla, en parte, un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 que se une a TGFβ, un dominio transmembrana y uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores inmunitarios; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 que se une a TGFβ, un dominio transmembrana y uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores inmunitarios. En una modalidad, los polipéptidos se unen entre sí por una señal de escisión polipeptídica, por ejemplo, una señal de escisión polipeptídica 2A.

En modalidades particulares, la presente descripción contempla, en parte, una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T CAR, que expresa un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 que se une a TGFβ, un dominio transmembrana y uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores inmunitarios; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 que se une a TGFβ, un dominio transmembrana y uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores inmunitarios.

En modalidades particulares, los dominios transmembrana y los dominios de señalización intracelular se aíslan de un receptor de IL-12, un receptor de IL-7, un receptor de IL-15, un receptor de IL-21, un receptor de IL-2, un receptor de IL-1, un receptor de IL-18, un receptor de IL-36, un receptor de IFN de tipo I, un receptor de TLR1, un receptor de TLR2, un receptor de TLR3, un receptor de TLR4, un receptor de TLR5, un receptor de TLR6, un receptor de TLR7, un receptor de TLR8, un receptor de TLR9 o un receptor de TLR10.

En modalidades particulares, los dominios transmembrana y los dominios de señalización intracelular se aíslan de IL-12Rβ2, IL-7Rα, IL-2Rγ, IL-2Rβ, IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2, IL-1RL2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 o TLR10.

La práctica de las modalidades particulares empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, química orgánica, biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante, genética, inmunología y biología celular que están dentro del conocimiento de la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con el propósito de ilustración. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Sambrook, y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3a edición, 2001); Sambrook, y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2da edición, 1989); Maniatis y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, actualizado en julio de 2008); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I y II (IRL Press, Oxford, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; así como también monografías en revistas como *Advances in Immunology*.

## B. Definiciones

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece

la invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción puede usarse en la práctica o prueba de modalidades particulares, las modalidades preferidas de composiciones, métodos y materiales se describen en la presente descripción. Para los propósitos de la presente descripción, los siguientes términos se definen a continuación.

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

10 Debe entenderse que el uso de la alternativa (por ejemplo, "o") significa una, ambas o cualquiera de sus combinaciones de alternativas.

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

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

25 A lo largo de esta descripción, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos declarados pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se entiende incluir cualquier elemento enumerado después de la frase, y limitado a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que no hay otros elementos presentes que afecten materialmente la actividad o acción de los elementos enumerados.

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

45 Un "antígeno (Ag)" se refiere a un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, que incluye composiciones (tales como una que incluye una proteína específica del cáncer) que se inyectan o absorben en un animal. Los antígenos ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, lípidos, carbohidratos, polisacáridos, glicoproteínas, péptidos o ácidos nucleicos. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, incluidos los inducidos por antígenos heterólogos, tales como los antígenos descritos.

50 Un "antígeno diana" o "antígeno diana de interés" es un antígeno que un dominio de unión contemplado en la presente descripción, se diseña para unirse. En modalidades particulares, el antígeno diana se selecciona del grupo que consiste en: receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha\beta 6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR, que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, Glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha 2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, STn, TAG72, TEMs, VEGFR2 y WT-1.

60 En una modalidad, el antígeno es un complejo de MHC-péptido, tal como un complejo de MHC de clase I-péptido o un complejo de MHC de clase II-péptido.

65 Como se usa en la presente, los términos "dominio de unión", "dominio extracelular", "dominio de unión a antígeno", "dominio de unión extracelular", "dominio de unión a antígeno extracelular", "dominio de unión específico a antígeno" y "dominio de unión específico a antígeno extracelular", se usan indistintamente y proporcionan a un polipéptido la

capacidad de unirse específicamente al antígeno diana de interés. El dominio de unión puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. Los ejemplos ilustrativos de dominios de unión incluyen, pero sin limitarse a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, dominios FN3 y DARPinas.

Los términos "afinidad de unión específica" o "se une específicamente" o "unido específicamente" o "aglutinación específica" o "se dirige específicamente a" como se usa en la presente descripción, describen la unión de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a un antígeno diana con mayor afinidad de unión que la unión de fondo. Un dominio de unión "se une específicamente" a un antígeno diana, si se une o se asocia con el antígeno con una afinidad o  $K_a$  (es decir, una constante de asociación de equilibrio de una interacción de unión particular con unidades de 1/M) de, por ejemplo, mayor que o igual a aproximadamente  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . En ciertas modalidades, un dominio de unión (o una proteína de fusión del mismo) se une a una diana con una  $K_a$  mayor o igual a alrededor de  $10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  o  $10^{13} \text{ M}^{-1}$ . Los dominios de unión de "alta afinidad" (o proteínas de fusión de cadena única de los mismos) se refieren a aquellos dominios de unión con una  $K_a$  de al menos  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{13} \text{ M}^{-1}$  o mayor.

Alternativamente, la afinidad puede definirse como una constante de disociación de equilibrio ( $K_d$ ) de una interacción de unión particular con unidades de M (por ejemplo,  $10^{-5} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , o menos). Las afinidades de los polipéptidos del dominio de unión pueden determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, mediante ELISA competitivo (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), o mediante asociación de unión, o ensayos de desplazamiento mediante el uso de ligandos marcados, o mediante el uso de un dispositivo de resonancia de plasmones superficiales tal como el Biacore T100, que está disponible en Biacore, Inc., Piscataway, NJ o tecnología de biosensor óptico como el sistema EPIC o EnSpire que están disponibles en Corning y Perkin Elmer respectivamente (ver también, por ejemplo, Scatchard y otros (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; y las patentes de Estados Unidos núms. 5,283,173; 5,468,614, o el equivalente).

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

Un "anticuerpo" se refiere a un agente aglutinante que es un polipéptido que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce y se une específicamente a un epítipo de un antígeno, tal como un lípido, carbohidrato, polisacárido, glicoproteína, péptido o ácido nucleico que contiene un determinante antigénico, tal como los reconocidos por una célula inmunitaria.

Un "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a la región de un antígeno a la que se une un agente aglutinante. Los anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como Ig de camello, Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos  $F(ab)'_2$ , fragmentos  $F(ab)_3$ , Fv, proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), bis-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, proteínas Fv estabilizadas por disulfuro ("dsFv"), y anticuerpo de dominio único (sdAb, Nanocuerpo) y porciones de anticuerpos de longitud completa responsables de la unión a antígeno. El término también incluye formas modificadas genéticamente tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Ver también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3ra Ed, W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

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

Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las CDR pueden definirse o identificarse mediante métodos convencionales, tal como mediante una secuencia de acuerdo con Kabat y otros (Wu, TT y Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970); Borden, P. y Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987); (ver, Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991), o por la estructura de acuerdo con Chothia y otros (Chothia, C. y Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196(4): 901-



917 (1987), Chothia, C. y otros, Nature, 342: 877 - 883 (1989)).

Los ejemplos ilustrativos de reglas para predecir las CDR de cadena ligera incluyen: CDR-L1 comienza en alrededor del residuo 24, está precedida por una Cys, tiene alrededor de 10-17 residuos, y le sigue un Trp (típicamente Trp-Tyr-Gln, pero también, Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu); CDR-L2 comienza alrededor de 16 residuos después del final de CDR-L1, está generalmente precedida por Ile-Tyr, pero también, Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe, y tiene 7 residuos; y CDR-L3 comienza alrededor de 33 residuos después del final de CDR-L2, está precedida por una Cys, tiene 7-11 residuos, y le sigue Phe-Gly-XXX-Gly (XXX es cualquier aminoácido) [SEQ ID NO:73].

Los ejemplos ilustrativos de reglas para predecir las CDR de cadena pesada incluyen: CDR-H1 comienza en alrededor del residuo 26, está precedida por Cys-XXX-XXX-XXX (SEQ ID NO:74), tiene 10-12 residuos y le sigue un Trp (típicamente Trp-Val, pero también, Trp-Ile, Trp-Ala); CDR-H2 inicia alrededor de 15 residuos después del final de la CDR-H1, generalmente está precedida por Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (SEQ ID NO:75), o una serie de variaciones, tiene 16-19 residuos, y le sigue Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala; y CDR-H3 comienza alrededor de 33 residuos después del final de CDR-H2, está precedida por Cys-XXX-XXX (típicamente Cys-Ala-Arg), tiene 3 a 25 residuos, y le sigue Trp-Gly-XXX-Gly (SEQ ID NO:76).

En una modalidad, las CDR de cadena ligera y las CDR de cadena pesada se determinan de acuerdo con el método Kabat

En una modalidad, las CDR de cadena ligera y las CDR2 y CDR3 de cadena pesada se determinan de acuerdo con el método Kabat, y la CDR1 de cadena pesada se determina de acuerdo con el método AbM, que es una comprende entre los métodos Kabat y Chothia, ver por ejemplo, Whitelegg N & Rees AR, Protein Eng. Dic 2000;13(12):819-24 y Methods Mol Biol. 2004;248:51-91. Los programas para predecir las CDR están disponibles públicamente, por ejemplo, AbYsis ([www.bioinf.org.uk/abysis/](http://www.bioinf.org.uk/abysis/)).

Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie, tal como los seres humanos. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando a partir del extremo N, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se ubica la CDR particular. Por lo tanto, las CDR localizadas en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, mientras que las CDR localizadas en el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de anticuerpo a anticuerpo, solo un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están directamente implicadas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos determinantes de especificidad (SDR).

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

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

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

Un "anticuerpo quimérico" tiene residuos marco de una especie, tal como un ser humano, y las CDR (que generalmente confieren unión a antígeno) de otra especie, tal como un ratón. En modalidades particulares preferidas, un dominio de unión específico a antígeno es un anticuerpo quimérico o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En modalidades particulares, el anticuerpo es un anticuerpo humano (tal como un anticuerpo monoclonal humano) o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno diana. Los anticuerpos humanos pueden construirse combinando secuencia(s) de dominio variable del clon Fv seleccionada(s) de bibliotecas de presentación en fagos derivadas de humanos con secuencia(s) de dominio constante humano conocida(s) como se describió anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales humanos pueden producirse mediante el método del hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur y otros, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner y otros, J. Immunol., 147: 86 (1991). Además, los animales transgénicos (por ejemplo, ratones) pueden usarse para producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Ver, por ejemplo, Jakobovits y otros, PNAS USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y otros, Nature,

362: 255 (1993); Bruggermann y otros, Year in Immunol., 7: 33 (1993). La transposición génica también puede usarse para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, anticuerpos de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo no humano inicial. Ver el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993. A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

Un anticuerpo "humanizado" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante", y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptor". En una modalidad, todas las CDR son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. No es necesario que las regiones constantes estén presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90 %, tal como aproximadamente 95 % o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones de aminoácidos conservadoras adicionales, que no tienen sustancialmente efecto sobre la unión a antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. Los anticuerpos humanizados pueden construirse por medio de ingeniería genética (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,585,089).

"Ig de camello" o "VHH de camélido" como se usa en la presente descripción se refiere a la unidad de unión a antígeno conocida más pequeña de un anticuerpo de cadena pesada (Koch-Nolte, y otros, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Un "anticuerpo de cadena pesada" o un "anticuerpo de camélido" se refiere a un anticuerpo que contiene dos dominios VH y no cadenas ligeras (Riechmann L. y otros, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); WO94/04678; WO94/25591; patente de Estados Unidos núm. 6,005,079).

"IgNAR" de "nuevo receptor antigénico de inmunoglobulina" se refiere a la clase de anticuerpos del repertorio inmunitario de tiburón que consiste en homodímeros de un dominio variable de nuevo receptor antigénico (VNAR) y cinco dominios constantes de nuevo receptor antigénico (CNAR). Los IgNAR representan algunos de los andamios de proteínas a base de inmunoglobulinas más pequeños conocidos y son altamente estables y poseen características de unión eficientes. La estabilidad inherente puede atribuirse tanto a (i) el andamio de Ig subyacente, que presenta un número considerable de residuos cargados e hidrófilos expuestos a la superficie en comparación con los dominios VH y VL de anticuerpos convencionales que se encuentran en anticuerpos murinos; como a (ii) las características estructurales estabilizantes en los lazos de la región determinante de complementariedad (CDR) que incluyen puentes disulfuro entre lazos, y patrones de enlaces de hidrógeno intralazo.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación de antígenos y aún es capaz de reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. En una modalidad, una especie de Fv bicatenaria consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación ajustada no covalente. En una especie de Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse covalentemente por un enlazador peptídico flexible de manera que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenaria. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis HVR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que todo el sitio de unión.

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

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

404,097; WO 1993/01161; Hudson y otros, Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger y otros, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson y otros, Nat. Med. 9:129-134 (2003).

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

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

Los anticuerpos monocatenarios pueden clonarse a partir de los genes de la región V de un hibridoma específico para una diana deseada. La producción de tales hibridomas se ha vuelto rutinaria. Se ha descrito una técnica que puede usarse para clonar la cadena pesada de región variable (V<sub>H</sub>) y la cadena ligera de región variable (V<sub>L</sub>), por ejemplo, en Orlandi y otros, PNAS, 1989; 86: 3833-3837.

Un "enlazador" se refiere a una pluralidad de residuos de aminoácidos entre los diversos dominios polipeptídicos, por ejemplo, entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, añadidos para la separación y conformación apropiadas de la molécula. En modalidades particulares, el enlazador es una secuencia de enlace de región variable. Una "secuencia de enlace de región variable", es una secuencia de aminoácidos que conecta los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> y proporciona una función separadora compatible con la interacción de los dos subdominios de unión de manera que el polipéptido resultante retiene una afinidad de unión específica a la misma molécula diana que un anticuerpo que comprende las mismas regiones variables de cadena ligera y pesada. En modalidades particulares, un enlazador separa uno o más dominios variables de cadena pesada o ligera, dominios bisagra, dominios de multimerización, dominios transmembrana, dominios coestimuladores y/o dominios de señalización primaria.

Los ejemplos ilustrados de enlazadores adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, las siguientes secuencias de aminoácidos: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 36); TGEKP (SEQ ID NO: 37) (ver, por ejemplo, Liu y otros, PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 38) (Pomerantz y otros 1995, supra); (GGGGS)<sub>n</sub> en donde n = 1, 2, 3, 4 o 5 (SEQ ID NO: 39) (Kim y otros, PNAS 93, 1156-1160 (1996.)); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 40) (Chaudhary y otros, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 41) (Bird y otros, 1988, Science 242:423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 42); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 43); LRQKDG-GGSERP (SEQ ID NO: 44); LRQKD(GGGS)<sub>2</sub>ERP (SEQ ID NO: 45). Alternativamente, los enlazadores flexibles pueden diseñarse racionalmente mediante el uso de un programa informático capaz de modelar tanto los sitios de unión al ADN como los péptidos en sí mismos (Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994) o mediante métodos de presentación en fagos. En una modalidad, el enlazador comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 46) (Cooper y otros, Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

Un "dominio separador", se refiere a un polipéptido que separa dos dominios. En una modalidad, un dominio separador mueve un dominio de unión a antígeno lejos de la superficie celular efectora para permitir un contacto célula/célula adecuado, unión a antígeno y activación (Patel y otros, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). En modalidades particulares, un dominio separador separa uno o más dominios variables de cadena pesada o ligera, dominios de multimerización, dominios transmembrana, dominios coestimuladores y/o dominios de señalización primaria. El dominio separador puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. En ciertas modalidades, un dominio separador es una porción de una inmunoglobulina, que incluye, pero no se limita a, una o más regiones constantes de la cadena pesada, *por ejemplo*, CH2 y CH3. El dominio separador puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

Un "dominio bisagra", se refiere a un polipéptido que desempeña un papel en la colocación del dominio de unión a antígeno lejos de la superficie celular efectora para permitir un contacto célula/célula adecuado, unión a antígeno y activación. En modalidades particulares, los polipéptidos pueden comprender uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio de multimerización, entre el dominio de unión y el dominio transmembrana (TM), o entre el dominio de multimerización y el dominio transmembrana. El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

Una "región bisagra alterada" se refiere a (a) una región bisagra de origen natural con hasta un 30 % de cambios de aminoácidos (por ejemplo, hasta el 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos), (b) una porción de una región bisagra de origen natural que tiene al menos 10 aminoácidos (por ejemplo, al menos 12, 13, 14 o 15 aminoácidos) de longitud con hasta un 30 % de cambios de aminoácidos (por ejemplo, hasta el 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos), o (c) una porción de una región bisagra de origen natural que comprende la región bisagra del núcleo (que puede tener 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15,

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

Un "dominio de multimerización", como se usa en la presente descripción, se refiere a un polipéptido que interactúa preferentemente o se asocia con otro polipéptido diferente directamente o a través de una molécula de formación de puentes, en donde la interacción de diferentes dominios de multimerización contribuye sustancialmente a o promueve eficientemente la multimerización (es decir, la formación de un dímero, trímero o complejo multipartita, que puede ser un homodímero, heterodímero, homotrímero, heterotrímero, homomultímero, heteromultímero). Un dominio de multimerización puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante.

Los ejemplos ilustrativos de dominios de multimerización adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen un polipéptido de FKBP, un polipéptido de FRB, un polipéptido de calcineurina, un polipéptido de ciclofilina, un polipéptido de DHFR bacteriano, un polipéptido de PYL1, un polipéptido de ABI1, un polipéptido de GIB1, un polipéptido de GAI o variantes de los mismos.

Un "factor de formación de puentes" se refiere a una molécula que se asocia con y que se dispone entre dos o más dominios de multimerización. En modalidades particulares, los dominios de multimerización contribuyen sustancialmente o promueven eficientemente la formación de un complejo polipeptídico solo en presencia de un factor de formación de puentes. En modalidades particulares, los dominios de multimerización no contribuyen o no promueven eficientemente la formación de un complejo polipeptídico en ausencia de un factor de formación de puentes. Los ejemplos ilustrativos de factores de formación de puentes adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, rapamicina (sirolimus) o un rapálogo de la misma, coumestricina o un derivado de la misma, giberelina o un derivado de la misma, ácido abscísico (ABA) o un derivado del mismo, metotrexato o un derivado del mismo, ciclosporina A o un derivado de la misma, FKCsA o un derivado del mismo, ligando sintético de trimetoprima (Tnp) para FKBP (SLF) o un derivado del mismo, o cualquiera de sus combinaciones.

Los análogos de rapamicina (rapálogos) incluyen, pero sin limitarse a, los descritos en la patente de Estados Unidos núm. 6,649,595. En ciertas modalidades, un factor de formación de puentes es un rapálogo con efecto inmunosupresor sustancialmente reducido en comparación con la rapamicina. En una modalidad preferida, el rapálogo de AP21967 (también conocido como C-16-(S)-7-metilindol-erapamicina,  $IC_{50} = 10$  nM, un análogo de rapamicina no inmunosupresor modificado químicamente).

Un "efecto inmunosupresor sustancialmente reducido" se refiere al menos, menos de 0,1 a 0,005 veces el efecto inmunosupresor observado o esperado para la misma dosis medida clínicamente o en un sustituto *in vitro* (por ejemplo, inhibición de la proliferación de células T) o *in vivo* de la actividad inmunosupresora humana.

Como se usa en la presente, "dominio ancla" se refiere a una secuencia de aminoácidos u otra molécula que promueve el conexión, anclaje o asociación de un receptor dimerizable a una superficie celular. Los dominios de anclaje ilustrativos incluyen una secuencia de aminoácidos con una estructura que es estable en una membrana celular o una secuencia de aminoácidos que promueve la adición de un glucolípido (también conocido como glucosil fosfatidilinositoles o GPI), o similares. En ciertas modalidades, un dominio de anclaje es un dominio hidrófobo (por ejemplo, dominio transmembrana) o una secuencia señal de GPI. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido contemplado en la presente descripción comprende un dominio de anclaje, opcionalmente en donde el dominio de anclaje es una molécula de GPI.

Un "dominio transmembrana" o "dominio TM" es un dominio que ancla un polipéptido a la membrana plasmática de una célula. El dominio TM puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante.

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

El término "función efectora" o "función celular efectora" se refiere a una función especializada de una célula efectora inmunitaria. La función efectora incluye, pero no se limita a, activación, producción de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, incluida la liberación de factores citotóxicos, u otras respuestas celulares provocadas por la unión del antígeno al receptor expresado en la célula efectora inmunitaria.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa de las células

T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, puede decirse que la activación de células T está mediada por dos clases distintas de dominios de señalización intracelular: dominios de señalización primaria que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) y dominios de señalización coestimuladores que actúan de una manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora.

Un "dominio de señalización primaria" se refiere a un dominio de señalización que regula la activación primaria del complejo TCR ya sea de manera estimuladora o de manera inhibidora. Los dominios de señalización primaria que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores o ITAM. Los ejemplos ilustrativos de ITAM que contienen dominios de señalización primaria que son adecuados para su uso en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a, los derivados de FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

Como se usa en la presente, el término "dominio de señalización coestimulador" o "dominio coestimulador" se refiere a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de superficie celular que no son receptores de antígeno o receptores de Fc que proporcionan una segunda señal requerida para una activación y función eficientes de los linfocitos T tras la unión al antígeno. Los ejemplos ilustrativos de tales moléculas coestimuladoras a partir de las cuales pueden aislarse dominios coestimuladores incluyen, pero sin limitarse a: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM y ZAP70.

Un "trastorno inmunitario" se refiere a una enfermedad que provoca una respuesta del sistema inmunitario. En modalidades particulares, el término "trastorno inmunitario" se refiere a un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o una inmunodeficiencia. En una modalidad, los trastornos inmunitarios abarcan enfermedades infecciosas.

Como se usa en la presente, el término "cáncer" se refiere generalmente a una clase de enfermedades o afecciones en las que las células anormales se dividen sin control y pueden invadir tejidos cercanos.

Como se usa en la presente, el término "neoplásico" se refiere a un cáncer en el que un grupo de células tumorales muestra uno o más de crecimiento no controlado (*es decir*, división más allá de los límites normales), invasión (*es decir*, intrusión y destrucción de tejidos adyacentes) y metástasis (*es decir*, propagación a otras ubicaciones del cuerpo a través de la linfa o la sangre). Como se usa en la presente, el término "metástasis" se refiere a la propagación del cáncer de una parte del cuerpo a otra. Un tumor formado por células que se han extendido se denomina "tumor metastásico" o "metástasis". El tumor metastásico contiene células que son similares a las del tumor original (primario).

Como se usa en la presente, el término "benigno" o "no maligno" se refiere a tumores que pueden crecer más grandes pero no se extienden a otras partes del cuerpo. Los tumores beneficiosos son autolimitados y típicamente no invaden ni hacen metástasis.

Una "célula cancerosa" se refiere a una célula individual de un crecimiento o tejido canceroso. Las células cancerosas incluyen cánceres sólidos y cánceres líquidos. Un "tumor" o "célula tumoral" se refiere generalmente a una inflamación o lesión formada por un crecimiento anormal de células, que pueden ser benigno, preneoplásico o neoplásico. La mayoría de los cánceres forman tumores, pero los cánceres líquidos, por ejemplo, leucemia, no necesariamente forman tumores. Para aquellos cánceres que forman tumores, los términos cáncer (célula) y tumor (célula) se usan indistintamente. La cantidad de un tumor en un individuo es la "carga tumoral", que puede medirse como el número, volumen o peso del tumor.

El término "recidiva" se refiere al diagnóstico de retorno, o signos y síntomas de retorno, de un cáncer después de un periodo de mejora o remisión.

"Remisión", también se denomina "remisión clínica", e incluye remisión parcial y completa. En remisión parcial, algunos, pero no todos, los signos y síntomas del cáncer han desaparecido. En remisión completa, todos los signos y síntomas del cáncer han desaparecido, aunque el cáncer aún puede estar en el cuerpo.

"Refractario" se refiere a un cáncer que es resistente a, o no responde a, la terapia con un agente terapéutico particular. Un cáncer puede ser refractario desde el inicio del tratamiento (*es decir*, no responde a la exposición inicial al agente terapéutico), o como resultado del desarrollo de resistencia al agente terapéutico, ya sea durante el transcurso de un primer periodo de tratamiento o durante un periodo de tratamiento posterior.

"Negativo para antígeno" se refiere a una célula que no expresa antígeno o expresa una cantidad insignificante de antígeno que es indetectable. En una modalidad, las células negativas al antígeno no se unen a los receptores dirigidos al antígeno. En una modalidad, las células negativas al antígeno no se unen sustancialmente a los receptores dirigidos al antígeno.

Una "enfermedad autoinmunitaria" se refiere a una enfermedad en la que el cuerpo produce una respuesta

inmunogénica (*es decir*, el sistema inmunitario) a algún constituyente de su propio tejido. En otras palabras, el sistema inmunitario pierde su capacidad de reconocer algún tejido o sistema dentro del cuerpo como "uno mismo" y lo ataca como si fuera extraño. Las enfermedades autoinmunitarias pueden clasificarse en aquellas en las que predominantemente se afecta a un órgano (por ejemplo, anemia hemolítica y tiroiditis antinmunitaria), y aquellas en las que el proceso de enfermedad autoinmunitaria se difunde a través de muchos tejidos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico). Por ejemplo, se cree que la esclerosis múltiple está causada por células T que atacan las envolturas que rodean las fibras nerviosas del cerebro y la médula espinal. Esto provoca pérdida de coordinación, debilidad y visión borrosa. Las enfermedades autoinmunitarias se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumática, anemia hemolítica, tiroiditis antinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis, diabetes, esclerodermia, psoriasis y similares.

Una "inmunodeficiencia" significa el estado de un paciente cuyo sistema inmunitario se ha visto comprometido por la enfermedad o por la administración de sustancias químicas. Esta afección hace que el sistema sea deficiente en el número y tipo de células sanguíneas necesarias para defenderse contra una sustancia extraña. Las afecciones o enfermedades de inmunodeficiencia se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, sida (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), SCID (enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave), deficiencia de IgA selectiva, inmunodeficiencia variable común, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de hiper-IgM y diabetes.

Una "enfermedad infecciosa" se refiere a una enfermedad que puede transmitirse de persona a persona o de organismo a organismo, y es causada por un agente microbiano o viral (por ejemplo, resfriado común). Las enfermedades infecciosas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, hepatitis, enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia, gonorrea), tuberculosis, VIH/SIDA, difteria, hepatitis B, hepatitis C, cólera e influenza.

Como se usa en la presente, los términos "individuo" y "sujeto" frecuentemente se usan indistintamente y se refieren a cualquier animal que exhiba un síntoma de cáncer u otro trastorno inmunitario que pueda tratarse con las composiciones y métodos contemplados en otra parte de la presente descripción. Los sujetos adecuados (por ejemplo, pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja, y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos. Los sujetos típicos incluyen pacientes humanos que tienen, han sido diagnosticados con o están en riesgo de tener cáncer u otro trastorno inmunitario.

Como se usa en la presente, el término "paciente" se refiere a un sujeto que ha sido diagnosticado con cáncer u otro trastorno inmunitario que puede tratarse con las composiciones y métodos descritos en otra parte de la presente descripción.

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

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

Como se usa en la presente, la frase "mejorar al menos un síntoma de" se refiere a disminuir uno o más síntomas de la enfermedad o afección para la cual se trata al sujeto. En modalidades particulares, la enfermedad o afección que se trata es un cáncer, en donde el uno o más síntomas mejorados incluyen, pero sin limitarse a, debilidad, fatiga, disnea, hematomas y hemorragias fáciles, infecciones frecuentes, agrandamiento de los nodos linfáticos, abdomen distendido o doloroso (debido a órganos abdominales dilatados), dolor óseo o articular, fracturas, pérdida de peso no planificada, poco apetito, sudoraciones nocturnas, fiebre leve persistente y disminución de la micción (debido a una función renal deficiente).

Por "potenciar" o "promover", o "aumentar" o "ampliar" se refiere generalmente a la capacidad de una composición contemplada en la presente descripción para producir, provocar o causar una mayor respuesta fisiológica (*es decir*, efectos aguas abajo) en comparación con la respuesta causada por cualquier vehículo o una molécula/composición de control. Una respuesta fisiológica medible puede incluir un aumento en la expansión de células T, activación, persistencia, secreción de citocinas y/o un aumento en la capacidad de destrucción de células cancerosas, entre otras evidentes a partir de la comprensión en la técnica y la descripción en la presente descripción. Una cantidad "aumentada" o "potenciada" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento

que es 1, 1, 1, 2, 1, 5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluidos todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, *etc.*) la respuesta producida por el vehículo o una composición de control.

Por "disminución" o "inferior", o "menos", o "reducir", o "anular" se refiere generalmente a la capacidad de la composición contemplada en la presente descripción para producir, provocar o causar una respuesta fisiológica menor (es decir, efectos aguas abajo) en comparación con la respuesta causada por el vehículo o una molécula/composición de control. Una "disminución" o cantidad "reducida" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución que es 1, 1, 1, 2, 1, 5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluidos todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, *etc.*) la respuesta (respuesta de referencia) producida por el vehículo, una composición de control o la respuesta en un linaje celular particular.

Por "mantenimiento", o "preservación", o "mantenimiento", o "sin cambio", o "sin cambio sustancial", o "sin disminución sustancial" se refiere generalmente a la capacidad de una composición contemplada en la presente descripción para producir, provocar o causar una respuesta fisiológica sustancialmente similar o comparable (es decir, efectos aguas abajo) en una célula, en comparación con la respuesta causada por cualquiera de los vehículos, una molécula/composición de control, o la respuesta en un linaje celular particular. Una respuesta comparable es una que no es significativamente diferente o medible diferente de la respuesta de referencia.

#### C. Convertidores de señal de TGF $\beta$ (Receptores de TGF $\beta$ quiméricos)

En modalidades particulares, se contempla un conversor de señal de TGF $\beta$  que transduce una señal inmunoestimuladora después de la exposición a TGF $\beta$ , que incluye pero no se limita a TGF $\beta$ 1. Como se usa en la presente, el término "conversor de señal de TGF $\beta$ " se refiere a uno o más polipéptidos de origen no natural que convierten señales inmunosupresoras de TGF $\beta$  del microentorno tumoral en señales inmunoestimuladoras en una célula T, por ejemplo, estimulando la actividad y función de las células efectoras inmunitarias, aumentando la producción y/o secreción de citocinas proinflamatorias. En modalidades particulares, el término "conversor de señal de TGF $\beta$ " se usa indistintamente con el término "receptor(es) de TGF $\beta$  quimérico(s)" o "CTBR" o "conversor de señal de CTBR".

En modalidades particulares, el conversor de señal de CTBR es un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ , un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero sin limitarse a, un receptor de citocinas, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo toll; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ , un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero sin limitarse a, un receptor de citocinas, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo toll.

En modalidades particulares, el conversor de señal de CTBR es un polipéptido de fusión que comprende un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ , un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero sin limitarse a, un receptor de citocinas, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo toll; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ , un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero sin limitarse a, un receptor de citocinas, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo toll.

En otras modalidades particulares, el conversor de señal de CTBR es un complejo de polipéptidos que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ , un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero sin limitarse a, un receptor de citocinas, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo toll; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ , un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero sin limitarse a, un receptor de citocinas, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones y un receptor de tipo toll.

Como se usa en la presente, el término "receptor inmunitario" se refiere a un receptor que se expresa en la superficie de una célula inmunitaria que modula una respuesta inmunitaria al unirse a su ligando afín. Los receptores inmunitarios adecuados para su uso en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a: receptores de citocinas, receptores de interleucina, receptores de reconocimiento de patrones y receptores de tipo toll, en donde la señalización a través del receptor inmunitario estimula una respuesta inmunitaria.

Los ejemplos ilustrativos de dominios de señalización transmembrana e intracelular de receptores inmunitarios que pueden usarse en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, dominios de señalización transmembrana e intracelular aislados de un receptor de IL-12, un receptor de IL-7, un receptor de IL-15, un receptor de IL-21, un receptor de IL-2, un receptor de IL-1, un receptor de IL-18, un receptor de

IL-36, un receptor de IFN de tipo I, un receptor de TLR1, un receptor de TLR2, un receptor de TLR3, un receptor de TLR4, un receptor de TLR5, un receptor de TLR6, un receptor de TLR7, un receptor de TLR8, un receptor de TLR9 o un receptor de TLR10.

Otros ejemplos ilustrativos de dominios de señalización transmembrana e intracelular de receptores inmunitarios que pueden usarse en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, dominios de señalización transmembrana e intracelular aislados de IL-12R $\beta$ 2, IL-7R $\alpha$ , IL-2R $\gamma$ , IL-2R $\beta$ , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2, IL-1RL2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 o TLR10.

Los ejemplos ilustrativos de dominios de señalización transmembrana e intracelular de receptor de citocina que pueden usarse en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, dominios de señalización transmembrana e intracelular aislados de IL-12R $\beta$ 2, IL-7R $\alpha$ , IL-2R $\gamma$ , IL-2R $\beta$ , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2 e IL-1RL2.

Los ejemplos ilustrativos de dominios de señalización transmembrana e intracelular del receptor de interleucina que pueden usarse en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, dominios de señalización transmembrana e intracelular aislados de IL-12R $\beta$ 2, IL-7R $\alpha$ , IL-2R $\gamma$ , IL-2R $\beta$ , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP e IL-1RL2.

Los ejemplos ilustrativos de dominios de señalización transmembrana e intracelular del receptor de tipo toll que pueden usarse en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, dominios de señalización transmembrana e intracelular aislados de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 e TLR10.

#### 1. Conversor de señal de CTBR12

La interleucina-12 (IL-12) es una citocina que promueve la función y actividad de las células T al aumentar, en parte, la expresión de IFN $\gamma$ , aumentar la proliferación de células T y potenciar la señalización de IL-12. La IL-12 se une al receptor de interleucina 12, beta 1 (IL-12R $\beta$ 1, también conocido como CD212) y al receptor de interleucina 12, beta 2 (IL-12R $\beta$ 2).

La señalización de IL-12 a través de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 da como resultado la fosforilación de STAT3, STAT4 y STATS. STAT3/STAT4 fosforilado se transloca al núcleo y se une al promotor de IFN $\gamma$  para aumentar la expresión de IFN $\gamma$ . STAT4 fosforilado también recluta el oncogén de Jun (c-Jun) al promotor de IFN $\gamma$  para aumentar la expresión de IFN $\gamma$  y potencia la señalización de IL-12 al aumentar la transcripción de IL-12R $\beta$ 2. La fosforilación de STATS aumenta la proliferación de células T.

La señalización de IL-12 también aumenta la expresión del receptor de interleucina 2, alfa (IL-2R) mediante el reclutamiento de STAT4 y c-Jun al promotor de IL-2R, lo que potencia de esta manera la proliferación de células T.

En varias modalidades, una o más células efectoras inmunitarias, que incluyen células efectoras inmunitarias que expresan un receptor de antígeno modificado genéticamente, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR12. En varias modalidades, una o más células efectoras inmunitarias se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR12 y un receptor de antígeno modificado genéticamente.

En modalidades particulares, el conversor de señal de CTBR12 convierte una señal de TGF $\beta$  inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-12. En modalidades particulares, un conversor de señal de CTBR12 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 1; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 2. En modalidades particulares, un conversor de señal de CTBR 12 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 2; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 1.

En modalidades particulares, un conversor de señal de CTBR12 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 1; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 2. En modalidades particulares, un conversor de señal de CTBR12 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 2; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio



transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 1.

En modalidades particulares, el conversor de señal de CTBR12 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 1; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 2. En modalidades particulares, el conversor de señal de CTBR12 es un complejo de polipéptidos que comprenden un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 2; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 1.

En ciertas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGF $\beta$ R1 o TGF $\beta$ R2. En ciertas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 1 o IL-12R $\beta$ 2. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 1 y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 2 y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 2 y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 1 y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral; con mayor preferencia, un polipéptido 2A de autoescisión viral; y con mayor preferencia un polipéptido de autoescisión viral seleccionado del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis equina A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thosa asigna (TaV) (T2A), un péptido de tescovirus-1 (PTV-1) (P2A) porcino, un péptido 2A de Theilovirus y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral P2A o T2A.

## 2. Conversor de señal de CTBR7

La interleucina-7 (IL-7) es una citocina que promueve la función y actividad de células T al mejorar, en parte, la supervivencia y proliferación de precursores de células T. La IL-7 se une al receptor alfa de interleucina 7 (IL-7R $\alpha$ , también conocido como CD127) y al receptor de interleucina 2, cadena gamma común (IL-2R $\gamma$ , también conocido como CD132 y yc). La señalización de IL-7 activa las vías de JAK/STAT, PI-3K y Src cinasa y da como resultado la transcripción de genes antiapoptóticos y genes que promueven la proliferación de precursores de células T.

En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias, que incluyen células efectoras inmunitarias que expresan un receptor de antígeno modificado genéticamente, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR7. En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR7 y un receptor de antígeno modificado genéticamente.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de TGF $\beta$  convierte una señal de TGF $\beta$  inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-7. En modalidades particulares (no acorde con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR7 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-7R $\alpha$ ; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2R $\gamma$ . En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR7 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2R $\gamma$ ; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-7R $\alpha$ .

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada) un conversor de señal de CTBR7 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-7R $\alpha$ ; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2R $\gamma$ . En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR7 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2R $\gamma$ ; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-7R $\alpha$ .

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR7 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-7R $\alpha$ ; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR7 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-7R $\alpha$ .

En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGF $\beta$ R1 o TGF $\beta$ R2. En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-7R $\alpha$  o IL-2Ry. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-7R $\alpha$  y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-2Ry y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-2Ry y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-7R $\alpha$  y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral; con mayor preferencia, un polipéptido 2A de autoescisión viral; y con mayor preferencia un polipéptido de autoescisión viral seleccionado del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis equina A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thoesa asigna (TaV) (T2A), un péptido de tescovirus-1 (PTV-1) (P2A) porcino, un péptido 2A de Theilovirus y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral P2A o T2A.

### 3. Conversor de señal de CTBR15

La interleucina-15 (IL-15) es una citocina que promueve la función y actividad de células T al mejorar, en parte, la supervivencia y proliferación de precursores de células T. La IL-15 se une con alta afinidad a IL-15R $\alpha$  (también conocido como CD215), que después se asocia con un complejo que comprende IL-2R $\beta$  (también conocido como IL-15R $\beta$  y CD122) e IL-2Ry (también conocido como CD132 e yc), expresado en la misma célula (presentación cis) o en una célula diferente (presentación trans). La señalización de IL-15 activa las vías de JAK/STAT, PI-3K y Src cinasa y da como resultado la transcripción de genes antiapoptóticos y genes que promueven la proliferación de precursores de células T.

En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias, que incluyen células efectoras inmunitarias que expresan un receptor de antígeno modificado genéticamente, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR15, y opcionalmente, un polinucleótido o vector que codifica un polipéptido IL-15R $\alpha$ . En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR15 y un receptor de antígeno modificado genéticamente, y opcionalmente, un polinucleótido o vector que codifica un polipéptido IL-15R $\alpha$ .

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de TGF $\beta$  convierte una señal de TGF $\beta$  inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-15. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR15 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2R $\beta$ ; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry. En modalidades particulares, (no de acuerdo con la invención reivindicada) un conversor de señal de CTBR15 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGFPR1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2R $\beta$ .

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada) un conversor de señal de CTBR15 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2R $\beta$ ; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de

señal de CTBR15 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Rβ.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR15 es un complejo de polipéptidos que comprenden un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Rβ; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR15 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Rβ.

En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGFβR1 o TGFβR2. En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-2Rβ o IL-2Ry. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-2Rβ y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-2Ry y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-2Ry y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-2Rβ y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral; con mayor preferencia, un polipéptido 2A de autoescisión viral; y con mayor preferencia un polipéptido de autoescisión viral seleccionado del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis equina A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thosa asigna (TaV) (T2A), un péptido de tescovirus-1 (PTV-1) (P2A) porcino, un péptido 2A de Theilovirus y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral P2A o T2A.

#### 4. Conversor de señal de CTBR21

La interleucina-21 (IL-21) es una citocina que promueve la función y actividad de células T al mejorar, en parte, la supervivencia y proliferación de precursores de células T. La IL-21 se une al receptor de interleucina 21 (IL-21R, también conocido como CD360) e IL-2Ry (también conocido como CD132 e yc). La señalización de IL-21 activa las vías de JAK/STAT, PI-3K y Src cinasa y da como resultado la transcripción de genes antiapoptóticos y genes que promueven la proliferación de precursores de células T.

En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias, que incluyen células efectoras inmunitarias que expresan un receptor de antígeno modificado genéticamente, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR21. En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR21 y un receptor de antígeno modificado genéticamente.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de TGFβ convierte una señal de TGFβ inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-21. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR21 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-21R; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR21 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de unión a TGFβ1 de TGFR1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-21R.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada) un conversor de señal de CTBR21 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de

señalización intracelular IL-21R; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR21 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-21R.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR21 es un complejo de polipéptidos que comprenden un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-21R; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR21 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-21R.

En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGFβR1 o TGFβR2. En ciertas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-21R o IL-2Ry (no de acuerdo con la invención reivindicada). En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-21R y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-2Ry y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-2Ry y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-21R y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral; con mayor preferencia, un polipéptido 2A de autoescisión viral; y con mayor preferencia un polipéptido de autoescisión viral seleccionado del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis equina A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thosa asigna (TaV) (T2A), un péptido de tescovirus-1 (PTV-1) (P2A) porcino, un péptido 2A de Theilovirus y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral P2A o T2A.

## 5. Conversor de señal de CTBR18

La interleucina-18 (IL-18) es una citocina que promueve la función y actividad de células T al aumentar, en parte, la expresión de IFNγ, aumentar la proliferación de células T y proteger contra la muerte celular inducida por activación (AICD). La IL-18 se une al receptor 1 de interleucina 18 (IL-18R1, también conocido como CD218a) y a la proteína complementaria del receptor de interleucina 18 (IL-18RAP, CD218b).

La señalización de IL-18 a través de IL-18R1 e IL-18RAP da como resultado la activación a través de la proteína adaptadora MyD88 y la fosforilación de IRAK4. La fosforilación de IRAK4 y la subsecuente fosforilación de IRAK1/2 conducen en última instancia a la activación de los factores de transcripción de NF-kappa B y AP-1 para aumentar la expresión de IFNγ y aumentar la sensibilidad a IL-12. El programa transcripcional inducido por IL-18 también aumenta la proliferación de células T y protege contra AICD.

En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias, que incluyen células efectoras inmunitarias que expresan un receptor de antígeno modificado genéticamente, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR18. En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR18 y un receptor de antígeno modificado genéticamente.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de TGFβ convierte una señal de TGFβ inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-18. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR18 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR18

contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de unión a TGFβ1 de TGFR1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR18 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR18 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR18 es un complejo de polipéptidos que comprenden un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR18 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP.

En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGFβR1 o TGFβR2. En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-18R1 o IL-18RAP. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-18RAP y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-18R1 y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR1 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-18R1 y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGFβR2 de unión a TGFβ1 y un dominio transmembrana de IL-18RAP y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral; con mayor preferencia, un polipéptido 2A de autoescisión viral; y con mayor preferencia un polipéptido de autoescisión viral seleccionado del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis equina A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thosa asigna (TaV) (T2A), un péptido de tescovirus-1 (PTV-1) (P2A) porcino, un péptido 2A de Theilovirus y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral P2A o T2A.

## 6. Conversor de señal de CTBR1

La interleucina-1 (IL-1) es una citocina que promueve la función y actividad de células T al aumentar, en parte, la expresión de IFNγ, aumentar la proliferación de células T y potenciar la protección contra la muerte celular inducida por activación (AICD). La IL-1 se une al receptor 1 interleucina 1 (IL-1R1, también conocido como CD121a) y la proteína complementaria del receptor de interleucina 1 (IL-1RAP).

La señalización de IL-1 a través de IL-1R1 e IL-1RAP da como resultado la activación a través de la proteína adaptadora MyD88 y la fosforilación de IRAK4. La fosforilación de IRAK4 y la posterior fosforilación de IRAK1/2 conducen en última instancia a la activación de los factores de transcripción NF-kappa B y AP-1 para aumentar la expresión de IFNγ y aumentar la sensibilidad a IL-12. El programa transcripcional inducido por IL-1 también aumenta la proliferación de células T y protege contra AICD.

En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias, que incluyen células efectoras inmunitarias que expresan un receptor de antígeno modificado genéticamente, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR1. En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR1 y un receptor de antígeno modificado genéticamente.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de TGF $\beta$  convierte una señal de TGF $\beta$  inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-1. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR1 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR1 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR1 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR1 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR1 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR1 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP.

En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGF $\beta$ R1 o TGF $\beta$ R2. En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-1R1 o IL-1RAP. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-1RAP y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-1R1 y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-1R1 y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de IL-1RAP y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral; con mayor preferencia, un polipéptido 2A de autoescisión viral; y con mayor preferencia un polipéptido de autoescisión viral seleccionado del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis equina A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thosa asigna (TaV) (T2A), un péptido de tescovirus-1 (PTV-1) (P2A) porcino, un péptido 2A de Theilovirus y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral P2A o T2A.

## 7. Conversor de señal de CTBR.TLR

Los receptores de tipo toll (TLR1 a TLR10) son receptores de reconocimiento de patrones que detectan patógenos invasores y activan las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. La activación de TLR por varios ligandos conduce a la inducción de un programa transcripcional proinflamatorio y la expresión de múltiples citocinas inflamatorias.

La señalización de TLR se produce mediante la homodimerización de dominios de señalización de TLR que conducen a la activación a través de la proteína adaptadora MyD88 y IRAK4. La fosforilación de IRAK4 y la subsecuente fosforilación de IRAK1/2 conducen en última instancia a la activación de los factores de transcripción NF-kappa B y AP-1 para aumentar la producción de citocinas inflamatorias e inducir la proliferación. La activación de TLR también puede conducir a la activación de factores de transcripción IRF3 e IRF7.

En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias, que incluyen células efectoras inmunitarias que expresan un receptor de antígeno modificado genéticamente, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR.TLR. En varias modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), una o más células efectoras inmunitarias se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un conversor de señal de CTBR.TLR y un receptor de antígeno modificado genéticamente.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de TGF $\beta$  convierte una señal de TGF $\beta$  inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por TLR. En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR.TLR contemplado en la presente descripción comprende: un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de TLR; una señal de escisión polipeptídica; y un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de TLR.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), un conversor de señal de CTBR.TLR contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de TLR; una señal de escisión polipeptídica; y un segundo polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de TLR idéntico.

En modalidades particulares (no de acuerdo con la invención reivindicada), el conversor de señal de CTBR.TLR es un complejo de polipéptidos que comprenden un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de TLR; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de TLR idéntico.

En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGF $\beta$ R1 o TGF $\beta$ R2. En ciertas modalidades (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio transmembrana de un TLR. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de TLR y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), un polipéptido comprende un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1 y un dominio transmembrana de TLR y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral; con mayor preferencia, un polipéptido 2A de autoescisión viral; y con mayor preferencia un polipéptido de autoescisión viral seleccionado del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis equina A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thossea asigna (TaV) (T2A), un péptido de tescovirus-1 (PTV-1) (P2A) porcino, un péptido 2A de Theilovirus y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión polipeptídica es un polipéptido de autoescisión viral P2A o T2A.

#### D. Receptores de antígenos modificados genéticamente

En modalidades particulares, un polipéptido comprende un receptor de antígeno modificado genéticamente, una señal de escisión polipeptídica y un CTBR. En otras modalidades particulares, un polinucleótido o vector que codifica un CTBR se introduce en una célula efectora inmunitaria que comprende un receptor de antígeno modificado genéticamente. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se contempla en modalidades particulares, que cualquier mecanismo conocido en la técnica puede usarse para introducir y coexpresar un receptor de antígeno modificado genéticamente y un CTBR en la misma célula efectora inmunitaria o población de células para aumentar la resistencia de las células efectoras inmunitarias al TME y potenciar y aumentar la eficiencia, potencia y durabilidad de la respuesta de las células efectoras inmunitarias.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias contempladas en la presente descripción comprenden un receptor de antígeno modificado genéticamente y un CTBR. En modalidades particulares, el receptor de antígeno modificado genéticamente es un receptor de células T (TCR) modificado genéticamente, un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor de DARIC o componentes de los mismos, o una zetacina.

##### 1. TCR modificados genéticamente

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias contempladas en la presente descripción comprenden un TCR modificado genéticamente y un conversor de señal de CTBR. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica un TCR modificado genéticamente y un conversor de señal de CTBR separado por una o más señales de escisión polipeptídica. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica un TCR modificado genéticamente y un polinucleótido o vector que codifica un conversor de señal de CTBR. En una modalidad,

las células T se modifican genéticamente para expresar un TCR modificado genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica un conversor de señal de CTBR.

Los receptores de células T de origen natural comprenden dos subunidades, una cadena alfa y una subunidad de cadena beta, cada una de las cuales es una proteína única producida por un evento de recombinación en el genoma de cada célula T. Las bibliotecas de TCR pueden tamizarse para determinar su selectividad con antígenos diana particulares. De esta manera, los TCR naturales, que tienen una alta avidéz y reactividad hacia los antígenos diana pueden seleccionarse, clonarse y subsecuentemente introducirse en una población de células T usadas para la inmunoterapia adoptiva.

En una modalidad, las células T se modifican mediante la introducción de una subunidad de TCR que tiene la capacidad de formar TCR que confieren especificidad a las células T para las células tumorales que expresan un antígeno diana. En modalidades particulares, las subunidades tienen una o más sustituciones, eliminaciones, inserciones o modificaciones de aminoácidos en comparación con la subunidad de origen natural, siempre que las subunidades retengan la capacidad de formar TCR y confiera a las células T transfectadas la capacidad de alojarse en el hogar hasta las células diana y participar en la señalización de citocinas inmunológicamente relevante. Los TCR modificados genéticamente preferentemente también se unen a las células diana que muestran el péptido asociado al tumor relevante con alta avidéz, y opcionalmente median la muerte eficiente de las células diana que presentan el péptido relevante in vivo.

Los ácidos nucleicos que codifican los TCR modificados genéticamente se aíslan preferentemente de su contexto natural en un cromosoma (de origen natural) de una célula T, y pueden incorporarse en vectores adecuados como se describe en otra parte de la presente descripción. Tanto los ácidos nucleicos como los vectores que los comprenden pueden transferirse a una célula, preferentemente a una célula T en modalidades particulares. Las células T modificadas son entonces capaces de expresar una o más cadenas de un TCR codificado por el ácido nucleico o ácidos nucleicos transducidos. En modalidades preferidas, el TCR modificado genéticamente es un TCR exógeno porque se introduce en células T que normalmente no expresan el TCR particular. El aspecto esencial de los TCR modificados genéticamente es que tiene una alta avidéz a un antígeno tumoral presentado por un complejo importante de histocompatibilidad (MHC) o un receptor inmunitario similar. Por el contrario de los TCR modificados genéticamente, los CAR se diseñan genéticamente para unirse a antígenos diana de una manera independiente del MHC.

El TCR puede expresarse con polipéptidos adicionales unidos a la porción amino terminal o carboxilo terminal de la cadena alfa o la cadena beta de un TCR siempre que el polipéptido adicional unido no interfiera con la capacidad de la cadena alfa o la cadena beta para formar un receptor funcional de células T y el reconocimiento del antígeno dependiente del MHC.

Los antígenos reconocidos por los TCR modificados genéticamente contemplados en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a, antígenos de cáncer, que incluyen antígenos tanto en cánceres hematológicos como en tumores sólidos. Los antígenos ilustrativos incluyen, pero sin limitarse al receptor de folato alfa, receptor de folato alfa, ST4, integrina  $\alpha\beta6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR, incluido ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, Glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM, VEGFR2 y WT-1.

## 2. Receptores de antígeno quiméricos

En varias modalidades, las células efectoras inmunitarias expresan CAR que redirige la citotoxicidad hacia las células tumorales. Los CAR son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpos para un antígeno diana (por ejemplo, antígeno tumoral) con un dominio intracelular de activación del receptor de células T para generar una proteína quimérica que exhibe una actividad inmunitaria celular antitumoral específica. Como se usa en la presente, el término "quimérico" describe que se compone de partes de diferentes proteínas o ADN de diferentes orígenes.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias contempladas en la presente descripción comprenden CAR y un conversor de señal de CTBR. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica un CAR y un conversor de señal de CTBR separado por una o más señales de escisión polipeptídica. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica un CAR y un polinucleótido o vector que codifica un conversor de señal de CTBR. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente para expresar un CAR mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica un conversor de señal de CTBR.

En varias modalidades, un CAR comprende un dominio extracelular que se une a un antígeno diana específico (también denominado dominio de unión o dominio de unión específico a antígeno), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. La principal característica de los CAR es su capacidad para redirigir la especificidad de la célula efectora inmunitaria, lo que desencadena de esta manera la proliferación, la producción de



citocinas, la fagocitosis o la producción de moléculas que pueden mediar la muerte celular del antígeno diana que expresa la célula de una manera independiente de la histocompatibilidad principal (MHC), explotando las capacidades de direccionamiento específicas de la célula de los anticuerpos monoclonales, ligandos solubles o correceptores específicos de la célula.

En modalidades particulares, los CAR comprenden un dominio de unión extracelular que se une específicamente a un polipéptido diana, por ejemplo, antígeno diana, expresado en células tumorales. Como se usa en la presente, los términos "dominio de unión", "dominio extracelular", "dominio de unión extracelular", "dominio de unión a antígeno", "dominio de unión a antígeno específico" y "dominio de unión a antígeno específico extracelular", se usan indistintamente y proporcionan un receptor quimérico, por ejemplo, un CAR o DARIC, con la capacidad de unirse específicamente al antígeno diana de interés. Un dominio de unión puede comprender cualquier proteína, polipéptido, oligopéptido o péptido que posea la capacidad de reconocer específicamente y unirse a una molécula biológica (por ejemplo, un receptor de superficie celular o proteína tumoral, lípido, polisacárido u otra molécula diana de superficie celular, o componente de la misma). Un dominio de unión incluye cualquier pareja de unión de origen natural, sintética, semisintética o producida de manera recombinante para una molécula biológica de interés.

En modalidades particulares, el dominio de unión extracelular comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Un "anticuerpo" se refiere a un agente aglutinante que es un polipéptido que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce y se une específicamente a un epítopo de un antígeno diana, tal como un péptido, lípido, polisacárido o ácido nucleico que contiene un determinante antigénico, tal como los reconocidos por una célula inmunitaria. Los anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno, por ejemplo, Ig de camello (un anticuerpo de camélido o fragmento VHH del mismo), Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'<sub>2</sub>, fragmentos F(ab)'<sub>3</sub>, Fv, anticuerpo Fv monocatenario ("scFv"), bis-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv"), y anticuerpo de dominio único (sdAb, Nanocuerpo) u otros fragmentos de anticuerpos de los mismos. El término también incluye formas modificadas genéticamente tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como, anticuerpos biespecíficos anticuerpos) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Ver también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3ra Ed., W H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

En una modalidad preferida, el dominio de unión es un scFv.

En otra modalidad preferida, el dominio de unión es un anticuerpo de camélido.

En modalidades particulares, el CAR comprende un dominio extracelular que se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: receptor de folato alfa, 5T4,  $\alpha\beta$ 6 integrina, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, Glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEMs, VEGFR2 y WT-1.

En modalidades particulares, los CAR comprenden un dominio de unión extracelular, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno, en donde el antígeno es un complejo de MHC-péptido, tal como un complejo de MHC de clase I-péptido o un complejo de MHC de clase II-péptido.

En ciertas modalidades, los CAR comprenden residuos enlazadores entre los diversos dominios. Una "secuencia de enlace de la región variable", es una secuencia de aminoácidos que conecta una región variable de la cadena pesada a una región variable de la cadena ligera y proporciona una función separadora compatible con la interacción de los dos subdominios de unión de manera que el polipéptido resultante retiene una afinidad de unión específica a la misma molécula diana que un anticuerpo que comprende las mismas regiones variables de la cadena ligera y pesada. En modalidades particulares, los CAR comprenden uno, dos, tres, cuatro o cinco o más enlazadores. En modalidades particulares, la longitud de un enlazador es de alrededor de 1 a alrededor de 25 aminoácidos, de alrededor de 5 a alrededor de 20 aminoácidos, o de alrededor de 10 a alrededor de 20 aminoácidos, o cualquier longitud intermedia de aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos de largo.

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

aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

En una modalidad, el dominio separador comprende la CH2 y CH3 de IgG1, IgG4 o IgD.

En una modalidad, el dominio de unión del CAR se enlaza a uno o más "dominios bisagra", que desempeña un papel en la colocación del dominio de unión a antígeno lejos de la superficie celular efectora para permitir un contacto célula/célula adecuado, unión a antígeno y activación. Un CAR generalmente comprende uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio transmembrana (TM). El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

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

En una modalidad, la bisagra es una bisagra PD-1 o una bisagra CD 152.

El "dominio transmembrana" es la porción del CAR que fusiona la porción de unión extracelular y el dominio de señalización intracelular y ancla el CAR a la membrana plasmática de la célula efectora inmunitaria. El dominio TM puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante.

Los dominios TM ilustrativos pueden derivarse de (es decir, comprender al menos la(s) región(iones) transmembrana de la cadena alfa o beta del receptor de células T, CD3 $\gamma$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\zeta$ , CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, AMN y PD-1.

En una modalidad, un CAR comprende un dominio TM derivado de CD8 $\alpha$ . En otra modalidad, un CAR contemplado en la presente descripción comprende un dominio TM derivado de CD8 $\alpha$  y un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud que unen el dominio TM y el dominio de señalización intracelular del CAR. Un enlazador de glicinaserina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

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

El término "función efectora" se refiere a una función especializada de la célula. La función efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o la ayuda o la actividad, incluida la secreción de una citocina. Por lo tanto, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de función efectora y que dirige a la célula a realizar una función especializada. Aunque usualmente puede emplearse todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar todo el dominio. En la medida en que se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular, tal porción truncada puede usarse en lugar de todo el dominio siempre que transduzca la señal de función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora.

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

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

Los ejemplos ilustrativos de ITAM que contienen dominios de señalización primaria adecuados para su uso en los CAR contemplados en modalidades particulares incluyen los derivados de FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En modalidades preferidas particulares, un CAR comprende un dominio de

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

5 En modalidades particulares, un CAR comprende uno o más dominios de señalización coestimuladora para mejorar la eficacia y expansión de células T que expresan receptores de CAR. Como se usa en la presente, el término "dominio de señalización coestimuladora" o "dominio coestimulador", se refiere a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora.

10 Los ejemplos ilustrativos de tales moléculas coestimuladoras adecuadas para su uso en los CAR contemplados en modalidades particulares incluyen TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM y ZAP70. En una modalidad, un CAR comprende uno o más dominios de señalización coestimuladora seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137 y CD134, y un dominio de señalización

15 primaria de CD3 $\zeta$ .  
En varias modalidades, el CAR comprende: un dominio extracelular que se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: BCMA, CD19, CSPG4, PSCA, ROR1 y TAG72; un dominio transmembrana aislado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD4, CD8 $\alpha$ , CD154 y PD-1; uno o más dominios intracelulares de  
20 señalización coestimuladora aislados de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137; y un dominio de señalización aislado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

### 3. DARIC

25 En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias comprenden una o más cadenas de un receptor DARIC. Como se usa en la presente, el término "receptor DARIC" se refiere a un receptor de antígeno modificado genéticamente de múltiples cadenas.

30 En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias contempladas en la presente descripción comprenden una o más cadenas de un receptor DARIC y un conversor de señal de CTBR. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica una o más cadenas de un receptor DARIC y un conversor de señal de CTBR separado por una o más señales de escisión polipeptídica. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido o vector que  
35 codifica una o más cadenas de un receptor DARIC y un polinucleótido o vector que codifica un conversor de señal de CTBR. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente para expresar una o más cadenas de un receptor DARIC se modifican adicionalmente mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica un conversor de señal de CTBR.

40 Los ejemplos ilustrativos de arquitecturas y componentes de DARIC se describen en la publicación PCT núm. WO2015/017214 y la publicación de patente de Estados Unidos núm. 20150266973.

En una modalidad, una plantilla de reparación donante comprende los siguientes componentes de DARIC: un polipéptido de señalización que comprende un primer dominio de multimerización, un primer dominio transmembrana  
45 y uno o más dominios intracelulares de señalización coestimuladora y/o dominios de señalización primaria; y un polipéptido de unión que comprende un dominio de unión, un segundo dominio de multimerización y opcionalmente un segundo dominio transmembrana. Un DARIC funcional comprende un factor de formación de puente que promueve la formación de un complejo de receptores DARIC en la superficie celular con el factor de formación de puente asociado con y dispuesto entre los dominios de multimerización del polipéptido de señalización y el polipéptido de  
50 unión.

En modalidades particulares, los dominios de multimerización primer y segundo se asocian con un factor de formación de puente seleccionado del grupo que consiste en: rapamicina o un rapálogo de la misma, coumermicina o un derivado de la misma, giberelina o un derivado de la misma, ácido abscísico (ABA) o un derivado del mismo, metotrexato o un  
55 derivado del mismo, ciclosporina A o un derivado de la misma, FKCsA o un derivado del mismo, ligando sintético de trimetoprima (Tmp) para FKBP (SLF) o un derivado del mismo, y cualquiera de sus combinaciones.

Los ejemplos ilustrativos de análogos de rapamicina (rapálogos) incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos núm. 6,649,595. En ciertas modalidades, un factor de formación de puentes es un rapálogo con efecto inmunosupresor  
60 sustancialmente reducido en comparación con la rapamicina. Un "efecto inmunosupresor sustancialmente reducido" se refiere a un rapálogo que tiene al menos, menos de 0,1 a 0,005 veces el efecto inmunosupresor observado o esperado para una cantidad equimolar de rapamicina, medida ya sea clínicamente o en un sustituto apropiado in vitro (por ejemplo, inhibición de la proliferación de células T) o in vivo de la actividad inmunosupresora humana. En una modalidad, "efecto inmunosupresor sustancialmente reducido" se refiere a un rapálogo que tiene un valor de EC50 en  
65 tal ensayo in vitro que es al menos de 10 a 250 veces mayor que el valor de EC50 observado para la rapamicina en el mismo ensayo.

Otros ejemplos ilustrativos de rapálogos incluyen, pero sin limitarse a, everolimus, novolimus, pimecrolimus, ridaforolimus, tacrolimus, temsirolimus, umirolimus y zotarolimus.

En ciertas modalidades, los dominios de multimerización se asociarán con un factor de formación de puente que es una rapamicina o un rapálogo de la misma. Por ejemplo, los dominios de multimerización primero y segundo son un par seleccionado de FKBP y FRB. Los dominios FRB son regiones polipeptídicas ("dominios" proteicos) que son capaces de formar un complejo tripartita con una proteína FKBP y rapamicina o rapálogo de la misma. Los dominios FRB están presentes en una serie de proteínas de origen natural, que incluyen proteínas mTOR (también denominadas en la literatura FRAP, RAPT1 o RAFT) de humanos y otras especies; proteínas de levadura que incluyen Tor1 y Tor2; y un homólogo de FRAP de *Cándida*. La información relativa a las secuencias de nucleótidos, clonación y otros aspectos de estas proteínas ya se conoce en la técnica. Por ejemplo, un número de acceso de secuencia de proteínas para una mTOR humana es el núm. de acceso de GenBank L34075.1 (Brown y otros, *Nature* 369:756, 1994).

Los dominios FRB adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en la presente descripción generalmente contienen al menos aproximadamente 85 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos. En ciertas modalidades, una secuencia de aminoácidos de FRB para su uso en proteínas de fusión de esta descripción comprenderá una secuencia de 93 aminoácidos Ile-2021 hasta Lys-2113 y una mutación de T2098L, en base a la secuencia de aminoácidos del núm. de acceso de GenBank L34075.1. Un dominio FRB para su uso en los DARIC contemplados en modalidades particulares será capaz de unirse a un complejo de una proteína FKBP unida a rapamicina o un rapálogo de la misma. En ciertas modalidades, una secuencia peptídica de un dominio FRB comprende (a) una secuencia peptídica de origen natural que abarca al menos la región de 93 aminoácidos indicada de mTOR humana o regiones correspondientes de proteínas homólogas; (b) una variante de un FRB de origen natural en el que hasta alrededor de diez aminoácidos, o de alrededor de 1 a alrededor de 5 aminoácidos o de alrededor de 1 a alrededor de 3 aminoácidos, o en algunas modalidades solo un aminoácido, del péptido de origen natural se han eliminado, insertado, o sustituido; o (c) un péptido codificado por una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse selectivamente con una molécula de ADN que codifica un dominio FRB de origen natural o por una secuencia de ADN que sería capaz, sino por la redundancia del código genético, de hibridar selectivamente con una molécula de ADN que codifica un dominio FRB de origen natural.

Las FKBP (proteínas de unión a FK506) son los receptores citosólicos para macrólidos, tales como FK506, FK520 y rapamicina, y están altamente conservadas entre líneas de especies. Las FKBP son proteínas o dominios proteicos que son capaces de unirse a la rapamicina o a un rapálogo de la misma y que forman además un complejo tripartita con una proteína que contiene FRB o proteína de fusión. Un dominio de FKBP también puede denominarse "dominio de unión a rapamicina". La información relativa a las secuencias de nucleótidos, clonación y otros aspectos de diversas especies de FKBP se conoce en la técnica (ver, por ejemplo, Staendart y otros, *Nature* 346:671, 1990 (FKBP12 humana); Kay, *Biochem. J.* 314:361, 1996). Las proteínas FKBP homólogas en otras especies de mamíferos, en levadura y en otros organismos también se conocen en la técnica y pueden usarse en las proteínas de fusión descritas en la presente descripción. Un dominio de FKBP contemplado en modalidades particulares será capaz de unirse a rapamicina o un rapálogo de la misma y participar en un complejo tripartita con una proteína que contiene FRB (según se pueda determinar por cualquier medio, directo o indirecto, para detectar tal unión).

Los ejemplos ilustrativos de dominios de FKBP adecuados para su uso en un DARIC contemplado en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a: una secuencia peptídica de FKBP de origen natural, preferentemente aislada de la proteína FKBP12 humana (número de acceso de GenBank AAA58476.1) o una secuencia peptídica aislada a partir de esta, de otra FKBP humana, de una FKBP murina o de otro mamífero, o de algún otro animal, FKBP de levadura o fúngica; una variante de una secuencia de FKBP de origen natural en la que hasta alrededor de diez aminoácidos, o de alrededor de 1 a alrededor de 5 aminoácidos o de alrededor de 1 a alrededor de 3 aminoácidos, o en algunas modalidades solo un aminoácido, del péptido de origen natural se han eliminado, insertado o sustituido; o una secuencia peptídica codificada por una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse selectivamente con una molécula de ADN que codifica una FKBP de origen natural o por una secuencia de ADN que sería capaz, sino por la redundancia del código genético, de hibridarse selectivamente con una molécula de ADN que codifica una FKBP de origen natural.

Otros ejemplos ilustrativos de pares de dominio de multimerización adecuados para su uso en un DARIC contemplado en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a, de FKBP y FRB, FKBP y calcineurina, FKBP y ciclofilina, FKBP y DHFR bacteriano, calcineurina y ciclofilina, PYL1 y ABI1, o GIB1 y GAI, o variantes de los mismos.

Aún en otras modalidades, un anti-factor de formación de puente bloquea la asociación de un polipéptido de señalización y un polipéptido de unión con el factor de formación de puente. Por ejemplo, la ciclosporina o FK506 podrían usarse como anti-factores de formación de puente para ajustar la rapamicina y, por lo tanto, detener la señalización ya que solo se une un dominio de multimerización. En ciertas modalidades, un anti-factor de formación de puente (por ejemplo, ciclosporina, FK506) es un agente inmunosupresor. Por ejemplo, puede usarse un anti-factor de formación de puente inmunosupresor para bloquear o minimizar la función de los componentes de DARIC contemplados en modalidades particulares y al mismo tiempo inhibir o bloquear una respuesta inflamatoria no deseada o patológica en un entorno clínico.

En una modalidad, el primer dominio de multimerización comprende FRB T2098L, el segundo dominio de multimerización comprende FKBP12 y el factor de formación de puente es el rapálogo AP21967.

5 En otra modalidad, el primer dominio de multimerización comprende FRB, el segundo dominio de multimerización comprende FKBP12, y el factor de formación de puente es Rapamicina, temsirolimus o everolimus.

10 En modalidades particulares, un polipéptido de señalización de un primer dominio transmembrana y un polipéptido de unión comprende un segundo dominio transmembrana o ancla GPI. Los ejemplos ilustrativos de los dominios transmembrana primero y segundo se aíslan de un polipéptido seleccionado independientemente del grupo que consiste en: CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, AMN y PD-1.

15 En una modalidad, un polipéptido de señalización comprende uno o más dominios intracelulares de señalización coestimuladora y/o dominios de señalización primaria.

20 Los ejemplos ilustrativos de dominios de señalización primaria adecuados para su uso en componentes de señalización de DARIC contemplados en modalidades particulares incluyen los derivados de FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En modalidades preferidas particulares, un componente de señalización de DARIC comprende un dominio de señalización primaria de CD3 y uno o más dominios de señalización coestimuladora. Los dominios intracelulares de señalización primaria y de señalización coestimuladora pueden unirse en cualquier orden en serie al extremo carboxilo del dominio transmembrana.

25 Los ejemplos ilustrativos de tales moléculas coestimuladoras adecuadas para su uso en los componentes de señalización de DARIC contemplados en modalidades particulares incluyen TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM y ZAP70. En una modalidad, un componente de señalización de DARIC comprende uno o más dominios de señalización coestimuladora seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137 y CD134, y un dominio de señalización primaria de CD3ζ.

30 En modalidades particulares, un componente de unión de DARIC comprende un dominio de unión. En una modalidad, el dominio de unión es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

35 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une a un epítipo de un antígeno diana, tal como un péptido, lípido, polisacárido o ácido nucleico que contiene un determinante antigénico, tal como los reconocidos por una célula inmunitaria. Los anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno, por ejemplo, Ig de camello (un anticuerpo de camélido o fragmento VHH del mismo), Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2, fragmentos F(ab)'3, Fv, anticuerpo Fv monocatenario ("scFv"), bis-scFv, (scFv)2, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv"), y anticuerpo de dominio único (sdAb, Nanocuerpo) u otros fragmentos de anticuerpos de los mismos. El término también incluye formas modificadas genéticamente tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Ver también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3ra Ed., W H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

45 En una modalidad preferida, el dominio de unión es un scFv.

En otra modalidad preferida, el dominio de unión es un anticuerpo de camélido.

50 En modalidades particulares, el componente de unión de DARIC comprende un dominio extracelular que se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: receptor de folato alfa, 5T4, αvβ6 integrina, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FRα, GD2, GD3, Glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEMs, VEGFR2 y WT-1.

60 En una modalidad, el componente de unión de DARIC comprende un dominio extracelular, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un complejo de MHC-péptido, tal como un complejo de MHC de clase I-péptido o un complejo de MHC de clase II-péptido.

65 En modalidades particulares, los componentes de DARIC contemplados en la presente descripción comprenden un enlazador o separador que conecta dos proteínas, polipéptidos, péptidos, dominios, regiones o motivos. En ciertas modalidades, un enlazador comprende de alrededor de dos a alrededor de 35 aminoácidos, o de alrededor de cuatro a alrededor de 20 aminoácidos o de alrededor de ocho a alrededor de 15 aminoácidos o de alrededor de 15 a alrededor

de 25 aminoácidos. En otras modalidades, un separador puede tener una estructura particular, tal como un dominio CH2CH3 de anticuerpo, un dominio bisagra o similares. En una modalidad, un separador comprende los dominios CH2 y CH3 de IgG1, IgG4 o IgD.

En modalidades particulares, los componentes de DARIC contemplados en la presente descripción comprenden uno o más "dominios bisagra", que desempeñan un papel en el posicionamiento de los dominios para permitir un contacto célula/célula adecuado, unión a antígeno y activación. Un DARIC puede comprender uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio de multimerización y/o el dominio transmembrana (TM) o entre el dominio de multimerización y el dominio transmembrana. El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada. En una modalidad particular, la bisagra es una bisagra de CD8α o una bisagra de CD4.

En una modalidad, un DARIC comprende un polipéptido de señalización que comprende un primer dominio de multimerización de FRB T2098L, un dominio transmembrana de CD8, un dominio coestimulador de 4-1BB y un dominio de señalización primaria de CD3ζ; el polipéptido de unión comprende un scFv que se une a CD19, un segundo dominio de multimerización de FKBP12 y un dominio transmembrana de CD4; y el factor de formación de puentes es el rapálogo AP21967.

En una modalidad, un DARIC comprende un polipéptido de señalización que comprende un primer dominio de multimerización de FRB, un dominio transmembrana de CD8, un dominio coestimulador de 4-1BB y un dominio de señalización primaria de CD3ζ; el polipéptido de unión comprende un scFv que se une a CD 19, un segundo dominio de multimerización de FKBP12 y un dominio transmembrana de CD4; y el factor de formación de puente es Rapamicina, temsirolimus o everolimus.

#### 4. ZETACINAS

En varias modalidades, las células efectoras inmunitarias comprenden un receptor de citocinas quiméricas que redirige la citotoxicidad hacia las células tumorales. Las zetacinas son inmunorreceptores transmembrana quiméricos que comprenden un dominio extracelular que comprende un ligando receptor soluble unido a una región de soporte capaz de unir el dominio extracelular a una superficie celular, una región transmembrana y un dominio de señalización intracelular. Las zetacinas, cuando se expresan en la superficie de los linfocitos T, dirigen la actividad de las células T a aquellas células que expresan un receptor para el que el ligando del receptor soluble es específico. Los inmunorreceptores quiméricos de zetacina redirige la especificidad de antígeno de las células T, con aplicación al tratamiento de una variedad de cánceres, particularmente a través de los sistemas de citocinas autocrinas/paracrinas utilizados por neoplasias malignas humanas.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias contempladas en la presente descripción comprenden una o más cadenas de un receptor de zetacina y un conversor de señal de CTBR. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica una o más cadenas de un receptor de zetacina y un conversor de señal de CTBR separado por una o más señales de escisión polipeptídica. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica una o más cadenas de un receptor de zetacina y un polinucleótido o vector que codifica un conversor de señal de CTBR. En una modalidad, las células T se modifican genéticamente para expresar una o más cadenas de un receptor de zetacina se modifican genéticamente aún más mediante la introducción de un polinucleótido o vector que codifica un conversor de señal de CTBR.

En modalidades particulares, la zetacina comprende una citocina inmunosupresora o variante de unión al receptor de citocinas de la misma, un enlazador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la citocina o variante de unión al receptor de citocinas de la misma se selecciona del grupo que consiste en: interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13).

En ciertas modalidades, el enlazador comprende un dominio CH2CH3, un dominio bisagra o similares. En una modalidad, un enlazador comprende los dominios CH2 y CH3 de IgG1, IgG4 o IgD. En una modalidad, un enlazador comprende un dominio bisagra de CD8α o CD4.

En modalidades particulares, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en: la cadena alfa o beta del receptor de células T, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, AMN y PD-1.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular se selecciona del grupo que consiste en: un dominio de señalización primaria que contiene ITAM y/o un dominio coestimulador.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular se selecciona del grupo que consiste en: FcRy,

FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular se selecciona del grupo que consiste en: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM y ZAP70.

En una modalidad, un receptor de citocinas quimérico comprende uno o más dominios de señalización coestimuladora seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137 y CD134, y un dominio de señalización primaria de CD3 $\zeta$ .

#### E. Polipéptidos

En la presente descripción se contemplan varios polipéptidos, que incluyen, pero sin limitarse a, polipéptidos conversores de señal de TGF $\beta$ , CTBR, TCR modificados genéticamente, CAR, DARIC, zetacinas, proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos anteriores y fragmentos de los mismos. En modalidades preferidas, un polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-71. "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente, a menos que se especifique lo contrario, y de acuerdo con el significado convencional, *es decir*, como una secuencia de aminoácidos. En una modalidad, un "polipéptido" incluye polipéptidos de fusión y otras variantes. Los polipéptidos pueden prepararse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas recombinantes y/o sintéticas bien conocidas. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica, por ejemplo, pueden comprender una secuencia de proteína de longitud completa, un fragmento de una proteína de longitud completa, o una proteína de fusión, y pueden incluir modificaciones postraduccionales del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como también otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural.

Un "péptido aislado" o un "polipéptido aislado" y similares, como se usa en la presente descripción, se refieren al aislamiento y/o purificación *in vitro* de una molécula peptídica o polipeptídica de un entorno celular, y de la asociación con otros componentes de la célula, *es decir*, no se asocia significativamente con sustancias *in vivo*.

Los polipéptidos incluyen "variantes polipeptídicas". Las variantes polipeptídicas pueden diferir de un polipéptido de origen natural en una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones. Tales variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores. Por ejemplo, en modalidades particulares, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de un polipéptido mediante la introducción de una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones del polipéptido. En modalidades particulares, los polipéptidos incluyen polipéptidos que tienen al menos alrededor de 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 86 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad aminoacídica con respecto a cualquiera de las secuencias de referencia contempladas en la presente descripción, típicamente donde la variante mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia.

Las variantes polipeptídicas incluyen "fragmentos polipeptídicos" biológicamente activos. Los ejemplos ilustrativos de fragmentos polipeptídicos biológicamente activos incluyen dominios de unión a ADN, dominios de nucleasa y similares. Como se usa en la presente, el término "fragmento biológicamente activo" o "fragmento biológicamente activo mínimo" se refiere a un fragmento polipeptídico que retiene al menos 100 %, al menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 %, al menos 60 %, al menos 50 %, al menos 40 %, al menos 30 %, al menos 20 %, al menos 10 % o al menos 5 % de la actividad polipeptídica de origen natural. En ciertas modalidades, un fragmento polipeptídico puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a alrededor de 1700 aminoácidos de largo. Se apreciará que en ciertas modalidades, los fragmentos son al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 o más aminoácidos de largo.

En modalidades particulares, los polipéptidos establecidos en la presente descripción pueden comprender uno o más aminoácidos indicados como "X." "X" si está presente en una SEQ ID NO de aminoácido, se refiere a cualquiera o más aminoácidos. En modalidades particulares, las SEQ ID NO que indican una proteína de fusión comprenden una secuencia de residuos X continuos que representan de manera acumulativa cualquier secuencia de aminoácidos.

Como se indicó anteriormente, los polipéptidos pueden alterarse de varias maneras que incluyen sustituciones, eliminaciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones se conocen generalmente en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido de referencia pueden prepararse mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones de las secuencias de nucleótidos se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Ciencias USA. 82: 488-492), Kunkel y otros, (1987, Methods in Enzymol, 154: 367-382), patente de Estados Unidos núm. 4,873,192, Watson, J. D. y otros, (Molecular Biology of the Gene, Cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias citadas en el mismo. La orientación sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés puede encontrarse en el modelo de Dayhoff y otros,

(1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

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

Tabla 1 - Codón de aminoácidos

| Tabla 1 - Codón de aminoácidos |                     |                       |         |     |     |     |     |     |
|--------------------------------|---------------------|-----------------------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Aminoácidos                    | Código de una letra | Código de tres letras | Codones |     |     |     |     |     |
| Alanina                        | A                   | Ala                   | GCA     | GCC | GCG | GCU |     |     |
| Cisteína                       | C                   | Cys                   | UGC     | UGU |     |     |     |     |
| Ácido aspártico                | D                   | Asp                   | GAC     | GAU |     |     |     |     |
| Ácido glutámico                | E                   | Glu                   | GAA     | GAG |     |     |     |     |
| Fenilalanina                   | F                   | Phe                   | UUC     | UUU |     |     |     |     |
| Glicina                        | G                   | Gly                   | GGA     | GGC | GGG | GGU |     |     |
| Histidina                      | H                   | His                   | CAC     | CAU |     |     |     |     |
| Isoleucina                     | I                   | Iso                   | AUA     | AUC | AUU |     |     |     |
| Lisina                         | K                   | Lis                   | AAA     | AAG |     |     |     |     |
| Leucina                        | L                   | Leu                   | UUA     | UUG | CUA | CUC | CUG | CUU |
| Metionina                      | M                   | Met                   | AUG     |     |     |     |     |     |
| Asparagina                     | N                   | Asn                   | AAC     | AAU |     |     |     |     |
| Prolina                        | P                   | Pro                   | CCA     | CCC | CCG | CCU |     |     |
| Glutamina                      | Q                   | Gln                   | CAA     | CAG |     |     |     |     |
| Arginina                       | R                   | Arg                   | AGA     | AGG | CGA | CGC | CGG | CGU |
| Serina                         | S                   | Ser                   | AGC     | AGU | UCA | UCC | UCG | UCU |
| Treonina                       | T                   | Thr                   | ACA     | ACC | ACG | ACU |     |     |
| Valina                         | V                   | Val                   | GUA     | GUC | GUG | GUU |     |     |
| Triptófano                     | W                   | Trp                   | UGG     |     |     |     |     |     |
| Tirosina                       | Y                   | Tyr                   | UAC     | UAU |     |     |     |     |

La orientación para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin suprimir la actividad biológica puede encontrarse mediante el uso de programas informáticos bien conocidos en la técnica, tales como DNASTAR, DNA Strider, Geneious, Mac Vector o Vector NTI software. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas descritas en la presente descripción son cambios de aminoácidos conservadores, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados de manera similar o sin carga. Un cambio conservador de aminoácidos implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En un péptido o proteína, los expertos en esta técnica conocen las sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos y generalmente pueden producirse sin alterar una actividad biológica de una molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (ver, por ejemplo, Watson y otros Molecular Biology of the Gene, 4a edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224).

En una modalidad, donde se desea la expresión de dos o más polipéptidos, las secuencias polinucleotídicas que las



codifican pueden separarse por una secuencia de IRES como se describe en otra parte de la presente descripción.

Los polipéptidos contemplados en modalidades particulares incluyen polipéptidos de fusión. En modalidades particulares, se proporcionan polipéptidos de fusión y polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión. Los polipéptidos de fusión y las proteínas de fusión se refieren a un polipéptido que tiene al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez segmentos polipeptídicos. En otra modalidad, dos o más polipéptidos pueden expresarse como una proteína de fusión que comprende una o más secuencias de polipéptidos de autoescisión como se describe en otra parte de la presente descripción.

Los polipéptidos de fusión pueden comprender uno o más dominios o segmentos polipeptídicos que incluyen, pero sin limitarse a, péptidos señal, dominios peptídicos permeables a las células (CPP), dominios de unión a ADN, dominios de nucleasa, *etc.*, etiquetas de epítipo (por ejemplo, proteína de unión a maltosa ("MBP"), glutatión S transferasa (GST), HIS6, MYC, FLAG, V5, VSV-G y HA), enlazadores polipeptídicos y señales de escisión polipeptídica. Los polipéptidos de fusión se unen típicamente del extremo C al extremo N, aunque también pueden unirse al extremo C, del extremo N al extremo N o del extremo N al extremo C. En modalidades particulares, los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden. Los polipéptidos de fusión o proteínas de fusión pueden incluir, además, variantes, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias y homólogos de interespecies modificados conservadoramente, siempre que se conserve la actividad deseada del polipéptido de fusión. Los polipéptidos de fusión pueden producirse mediante métodos químicos sintéticos o mediante enlace químico entre las dos fracciones o pueden prepararse generalmente mediante el uso de otras técnicas estándar. Las secuencias de ADN ligadas que comprenden el polipéptido de fusión se unen operativamente a elementos de control transcripcional o traduccional adecuados como se describe en otra parte de la presente descripción.

Los polipéptidos de fusión pueden comprender opcionalmente un enlazador que puede usarse para unir el uno o más polipéptidos o dominios dentro de un polipéptido. Una secuencia enlazadora peptídica puede emplearse para separar dos o más componentes polipeptídicos cualquiera una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras secundarias y terciarias apropiadas para permitir que los dominios polipeptídicos ejerzan sus funciones deseadas. Tal secuencia enlazadora peptídica se incorpora en el polipéptido de fusión mediante el uso de técnicas estándar en la técnica. Las secuencias enlazadoras peptídicas adecuadas pueden elegirse en base a los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pueda interactuar con epítopos funcionales en los polipéptidos primero y segundo; y (3) la falta de residuos hidrófobos o cargados que puedan reaccionar con los epítopos funcionales polipeptídicos. Las secuencias enlazadoras peptídicas preferidas contienen residuos de Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala también pueden usarse en la secuencia enlazadora. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como enlazadores incluyen las descritas en Maratea y otros, *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262, 1986; patente de Estados Unidos núm. 4,935,233 y patente de Estados Unidos núm. 4,751,180. No se requieren secuencias enlazadoras cuando un segmento del polipéptido de fusión particular contiene regiones de aminoácidos no esenciales del extremo N que pueden usarse para separar los dominios funcionales y evitar interferencias estéricas. Los enlazadores preferidos son típicamente subsecuencias de aminoácidos flexibles que se sintetizan como parte de una proteína de fusión recombinante. Los polipéptidos enlazadores pueden tener entre 1 y 200 aminoácidos de longitud, entre 1 y 100 aminoácidos de longitud, o entre 1 y 50 aminoácidos de longitud, que incluyen todos los valores enteros intermedios.

Las señales de escisión polipeptídica ilustrativas incluyen sitios de reconocimiento de escisión polipeptídica tales como sitios de escisión por proteasas, sitios de escisión por nucleasas (por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción raras, sitios de reconocimiento de ribozimas de autoescisión) y oligopéptidos virales de autoescisión (*ver deFelipe y Ryan, 2004. Traffic, 5(8); 616-26*).

El experto en la técnica conoce los sitios de escisión por proteasas y los péptidos de autoescisión adecuados (*ver, por ejemplo, en Ryan y otros, 1997. J. Gener. Virol. 78, 699-722; Scymczak y otros (2004) Nature Biotech. 5, 589-594*). Los sitios de escisión por proteasas ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, los sitios de escisión de las NIa proteasas de potyvirus (por ejemplo, proteasa del virus del grabado del tabaco), HC proteasas de potyvirus, P1 (P35) proteasas de potyvirus, NIa proteasas de byovirus, proteasas codificadas por RNA-2 de byovirus, L proteasas de aftovirus, 2A proteasas de enterovirus, 2A proteasas de comovirus, 3C proteasas de picorna, 24K proteasas, 24K proteasas de nepovirus, similar a 3C proteasa de RTSV (vírico esférico tungro de arroz), similar a 3C proteasa de PYVF (virus de la coca amarilla) proteasa, heparina, trombina, factor Xa y enteroquinasa. Debido a su alta rigurosidad de escisión, los sitios de escisión de la proteasa de TEV (virus del grabado del tabaco) se prefieren en una modalidad, por ejemplo, EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 47), por ejemplo, ENLYFQG (SEQ ID NO: 48) y ENLYFQS (SEQ ID NO: 49), en donde X representa cualquier aminoácido (se produce escisión por TEV entre Q y G o Q y S).

En ciertas modalidades, el sitio polipeptídico de autoescisión comprende un sitio, secuencia o dominio similar a 2A o 2A (Donnelly y otros, 2001. *J. Gen. Virol. 82:1027-1041*). En una modalidad particular, el péptido 2A viral es un péptido 2A de aftovirus, un péptido 2A de potyvirus o un péptido 2A de cardiovirus.

En una modalidad, el péptido 2A viral se selecciona del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis equina A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thovirus

asigna (TaV) (T2A), un péptido del tescovirus-1 porcino (PTV-1) (P2A), un péptido del Teilovirus 2A y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis.

En la Tabla 2 se proporcionan ejemplos ilustrativos de sitios 2A.

Tabla 2:

|               |  |
|---------------|--|
| SEQ ID NO: 50 | GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP                   |
| SEQ ID NO: 51 | ATNFSLLKQAGDVEENPGP                      |
| SEQ ID NO: 52 | LLKQAGDVEENPGP                           |
| SEQ ID NO: 53 | GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP                    |
| SEQ ID NO: 54 | EGRGSLLTCGDVEENPGP                       |
| SEQ ID NO: 55 | LLTCGDVEENPGP                            |
| SEQ ID NO: 56 | GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP                  |
| SEQ ID NO: 57 | QCTNYALLKLAGDVESNPGP                     |
| SEQ ID NO: 58 | LLKLAGDVESNPGP                           |
| SEQ ID NO: 59 | GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP                |
| SEQ ID NO: 60 | VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP                   |
| SEQ ID NO: 61 | LLKLAGDVESNPGP                           |
| SEQ ID NO: 62 | LLNFDLLKLAGDVESNPGP                      |
| SEQ ID NO: 63 | TLNFDLLKLAGDVESNPGP                      |
| SEQ ID NO: 64 | LLKLAGDVESNPGP                           |
| SEQ ID NO: 65 | NFDLLKLAGDVESNPGP                        |
| SEQ ID NO: 66 | QLLNFDLLKLAGDVESNPGP                     |
| SEQ ID NO: 67 | APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP                 |
| SEQ ID NO: 68 | VTELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT   |
| SEQ ID NO: 69 | LNFDLLKLAGDVESNPGP                       |
| SEQ ID NO: 70 | LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP |
| SEQ ID NO: 71 | EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP        |

En modalidades preferidas, un polipéptido comprende un polipéptido conversor de señal de CTBR.

#### F. Polinucleótidos

En modalidades particulares, se proporcionan polinucleótidos que codifican polipéptidos conversores de señal de TGF $\beta$ , CTBR, TCR modificados genéticamente, CAR, DARIC, zetacinas, proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos anteriores y fragmentos de los mismos. Como se usa en la presente, los términos "polinucleótido" o "ácido nucleico" se refieren al ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) e híbridos de ADN/ARN. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios y recombinantes, sintéticos o aislados. Los polinucleótidos incluyen, pero sin limitarse a: ARN premensajero (ARNmp), ARN mensajero (ARNm), ARN, ARN de interferencia corto (ARNic), ARN de horquilla corta (ARNhc), microARN (ARNmi), ribozimas, ARN genómico (ARNg), ARN de cadena mayor (ARN(+)), ARN de cadena menor (ARN(-)), ARNtracr, ARNcr, ARN de guía única (ARNgu), ARN sintético, ARNm sintético, ADN genómico (ADNg), ADN amplificado por PCR, ADN complementario (ADNc), ADN sintético o ADN recombinante. Los polinucleótidos se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 1000, al menos 10 000, o al menos 15 000 o más nucleótidos de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, así como también todas las longitudes intermedias. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tales como 6, 7, 8, 9, etc., 101, 102, 103, etc.; 151, 152, 153, etc.; 201, 202, 203, etc. En modalidades particulares, los polinucleótidos o variantes tienen al menos o alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de

identidad de secuencia con respecto a una secuencia de referencia.

En modalidades particulares, los polinucleótidos pueden tener codones optimizados. Como se usa en la presente, el término "optimización de codones" se refiere a sustituir codones en un polinucleótido que codifica un polipéptido para aumentar la expresión, estabilidad y/o actividad del polipéptido. Los factores que influyen en la optimización de codones incluyen, pero sin limitarse a, uno o más de: (i) variación de los sesgos de codones entre dos o más organismos o genes o tablas de sesgo construidas sintéticamente, (ii) variación en el grado de sesgo de codones dentro de un organismo, gen, o conjunto de genes, (iii) variación sistemática de codones, incluido el contexto, (iv) variación de codones de acuerdo con sus ARNt decodificantes, (v) variación de codones de acuerdo con % de GC, en general o en una posición del triplete, (vi) variación en el grado de similitud con una secuencia de referencia, por ejemplo, una secuencia de origen natural, (vii) variación en el nivel de corte de frecuencia de codones, (viii) propiedades estructurales de los ARNm transcritos a partir de la secuencia de ADN, (ix) conocimiento previo sobre la función de las secuencias de ADN en las que se basa el diseño del conjunto de sustituciones de codones, (x) variación sistemática de conjuntos de codones para cada aminoácido y/o (xi) eliminación aislada de sitios de iniciación de la traducción falsa.

Como se usa en la presente, el término "nucleótido" se refiere a una base nitrogenada heterocíclica en enlace N-glucosídico con un azúcar fosforilado. Se entiende que los nucleótidos incluyen bases naturales, y una amplia variedad de bases modificadas reconocidas en la técnica. Tales bases se localizan generalmente en la posición 1' de un resto de azúcar de nucleótidos. Los nucleótidos generalmente comprenden una base, azúcar y un grupo fosfato. En el ácido ribonucleico (ARN), el azúcar es una ribosa, y en el ácido desoxirribonucleico (ADN) el azúcar es una desoxirribosa, es decir, un azúcar que carece de un grupo hidroxilo que está presente en la ribosa. Las bases nitrogenadas naturales ilustrativas incluyen las purinas, la adenosina (A) y la guanidina (G), y las pirimidinas, la citidina (C) y la timidina (T) (o en el contexto del ARN, uracilo (U)). El átomo C-1 de la desoxirribosa se une a N-1 de una pirimidina o N-9 de una purina. Los nucleótidos son usualmente mono, di o trifosfatos. Los nucleótidos pueden no modificarse o modificarse en el resto de azúcar, fosfato y/o base, (también denominados indistintamente como análogos de nucleótidos, derivados de nucleótidos, nucleótidos modificados, nucleótidos no naturales, y nucleótidos no estándar; ver por ejemplo, los documentos WO 92/07065 y WO 93/15187). Los ejemplos de bases de ácidos nucleicos modificadas se resumen por Limbach y otros, (1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183-2196).

Un nucleótido también puede considerarse un éster de fosfato de un nucleósido, donde la esterificación se produce en el grupo hidroxilo unido al C-5 del azúcar. Como se usa en la presente, el término "nucleósido" se refiere a una base nitrogenada heterocíclica en enlace N-glucosídico con un azúcar. Se reconoce en la técnica que los nucleósidos incluyen bases naturales, y también incluyen bases modificadas bien conocidas. Tales bases se localizan generalmente en la posición 1' de un resto de azúcar de nucleósido. Los nucleósidos generalmente comprenden una base y un grupo de azúcar. Los nucleósidos pueden no modificarse o modificarse en el resto de azúcar, y/o base, (también denominados indistintamente análogos de nucleósidos, derivados de nucleósidos, nucleósidos modificados, nucleósidos no naturales, o nucleósidos no estándar). Como también se indicó anteriormente, los ejemplos de bases de ácidos nucleicos modificadas se resumen por Limbach y otros, (1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183-2196).

Los ejemplos ilustrativos de polinucleótidos incluyen, pero sin limitarse a, polinucleótidos que codifican las SEQ ID NO: 1-71.

En varias modalidades ilustrativas, los polinucleótidos contemplados en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, polinucleótidos que codifican conversores de señal de TGF $\beta$ , conversores de señal de CTBR, receptores de antígenos modificados genéticamente, polipéptidos de fusión y vectores de expresión, vectores virales y plásmidos de transferencia que comprenden polinucleótidos contemplados en la presente descripción.

Como se usa en la presente, los términos "variante polinucleotídica" y "variante" y similares se refieren a polinucleótidos que muestran una identidad de secuencia sustancial con una secuencia polinucleotídica de referencia que se hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen a continuación. Estos términos también abarcan polinucleótidos que se distinguen de un polinucleótido de referencia mediante la adición, eliminación, sustitución o modificación de al menos un nucleótido. En consecuencia, los términos "variante polinucleotídica" y "variante" incluyen polinucleótidos en los que uno o más nucleótidos se han añadido o eliminado, o modificado, o reemplazado con diferentes nucleótidos. Con respecto a esto, se entiende bien en la técnica que ciertas alteraciones que incluyen mutaciones, adiciones, eliminaciones y sustituciones pueden realizarse a un polinucleótido de referencia de manera que el polinucleótido alterado retiene la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia.

En una modalidad, un polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana en condiciones rigurosas. Para hibridar en "condiciones rigurosas" se describen protocolos de hibridación en los que las secuencias de nucleótidos al menos 60 % idénticas entre sí permanecen hibridadas. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas que sean alrededor de 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a una resistencia iónica y pH definidos. La T<sub>m</sub> es la temperatura (bajo la concentración definida de fuerza iónica, pH y ácido nucleico) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Dado que las secuencias diana están generalmente

presentes en exceso, a Tm, el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio.

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

Los términos usados para describir las relaciones de secuencias entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es de al menos 12 pero con frecuencia de 15 a 18 y frecuentemente al menos 25 unidades de monómero, que incluyen nucleótidos y residuos de aminoácidos, de longitud. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (*es decir*, solo una porción de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, generalmente alrededor de 50 a alrededor de 100, más usualmente alrededor de 100 a alrededor de 150 en el que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean óptimamente. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (*es decir*, interrupciones) de alrededor de 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones informatizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en la versión 7.0 del paquete de software Genetics de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, Estados Unidos) o mediante inspección y la mejor alineación (*es decir*, lo que da como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia de programas BLAST como se describe por ejemplo en Altschul y otros, 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389. Una discusión detallada del análisis de secuencias puede encontrarse en la Unidad 19.3 de Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

Como se usa en la presente, "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido que se ha purificado de las secuencias que lo flanquean en un estado de origen natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que son normalmente adyacentes al fragmento. Un "polinucleótido aislado" se refiere además a un ADN complementario (ADNc), un ADN recombinante, u otro polinucleótido que no existe en la naturaleza y que se ha producido por la mano del hombre.

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

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

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

Además, los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la redundancia del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido, o fragmento de variante del mismo, como se describe en la presente descripción. Algunos de estos polinucleótidos tienen homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente en modalidades particulares, por ejemplo, los polinucleótidos que se optimizan para la selección de codones humanos y/o de primates. En particular, los polinucleótidos tienen codones optimizados para la expresión y/o estabilidad. Además, también pueden usarse alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente descripción. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos.

El término "casete de ácido nucleico" o "casete de expresión" como se usa en la presente se refiere a secuencias genéticas dentro del vector que pueden expresar un ARN, y subsecuentemente un polipéptido. En una modalidad, el casete de ácido nucleico contiene un(os) gen(es) de interés, por ejemplo, un(os) polinucleótido(s) de interés. En otra modalidad, el casete de ácido nucleico contiene una o más secuencias de control de la expresión, por ejemplo, un promotor, potenciador, secuencia poli(A), y un(os) gen(es) de interés, por ejemplo, un(os) polinucleótido(s) de interés. Los vectores pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más casetes de ácido nucleico. El casete de ácido nucleico se orienta posicional y secuencialmente dentro del vector de manera que el ácido nucleico en el casete puede transcribirse en ARN, y cuando sea necesario, traducirse en una proteína o un polipéptido, someterse a modificaciones postraduccionales apropiadas requeridas para la actividad en la célula transformada, y translocarse al compartimento apropiado para la actividad biológica al dirigirse a compartimentos intracelulares apropiados o secretarse en compartimentos extracelulares. Preferentemente, el casete tiene sus extremos 3' y 5' adaptados para la inserción lista en un vector, por ejemplo, tiene sitios de endonucleasa de restricción en cada extremo. En una modalidad preferida, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de un gen terapéutico usado para tratar, prevenir o mejorar un trastorno genético. El casete puede retirarse e insertarse en un plásmido o vector viral como una única unidad.

Los polinucleótidos incluyen polinucleótido(s) de interés. Como se usa en la presente, el término "polinucleótido de interés" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido o polipéptido de fusión o un polinucleótido que sirve como plantilla para la transcripción de un polinucleótido inhibidor, como se contempla en la presente descripción.

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

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

Los ejemplos ilustrativos de vectores incluyen, pero sin limitarse a, plásmido, secuencias de replicación autónoma y elementos transponibles, por ejemplo, Sleeping Beauty, PiggyBac.

Los ejemplos ilustrativos adicionales de vectores incluyen, sin limitación, plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales tales como cromosoma artificial de levadura (YAC), cromosoma artificial bacteriano (BAC), o cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), bacteriófagos tales como fago lambda o fago M13, y virus animales.

Los ejemplos ilustrativos de virus útiles como vectores incluyen, sin limitación, retrovirus (que incluye lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (por ejemplo, SV40).

Los ejemplos ilustrativos de vectores de expresión incluyen, pero sin limitarse a, vectores pCIneo (Promega) para la expresión en células de mamíferos; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia y expresión génica mediada por lentivirus en células de mamíferos. En modalidades particulares, las secuencias codificantes de polipéptidos descritos en la presente descripción pueden ligarse a tales vectores de expresión para la expresión de los polipéptidos en células de mamíferos.

En modalidades particulares, el vector es un vector episomal o un vector que se mantiene extracromosómicamente. Como se usa en la presente, el término "episomal" se refiere a un vector que es capaz de replicarse sin integración en el ADN cromosómico del huésped y sin pérdida gradual de una célula huésped que se divide, lo que significa además que dicho vector se replica extracromosómicamente o episomalmente.

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

En modalidades particulares, un polinucleótido comprende un vector, que incluye pero no se limita a vectores de expresión y vectores virales. Un vector puede comprender una o más secuencias de control exógenas, endógenas o heterólogas tales como promotores y/o potenciadores. Una "secuencia de control endógena" es una que se une naturalmente con un gen dado en el genoma. Una "secuencia de control exógena" es una que se coloca en yuxtaposición a un gen por medio de manipulación genética (es decir, técnicas biológicas moleculares) de manera que la transcripción de ese gen es dirigida por el potenciador/promotor unido. Una "secuencia de control heteróloga" es una secuencia exógena que es de una especie diferente a la célula que se manipula genéticamente. Una secuencia de control "sintética" puede comprender elementos de una secuencia endógena y/o exógena más, y/o secuencias determinadas *in vitro* o *in silico* que proporcionan una actividad óptima del promotor y/o potenciador para la terapia particular.

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

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

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

Como se usa en la presente, el término "secuencia de control de la expresión constitutiva" se refiere a un promotor, potenciador o promotor/potenciador que permite continua o continuamente la transcripción de una secuencia unida operativamente. Una secuencia de control de la expresión constitutiva puede ser un promotor, potenciador o promotor/potenciador "ubicuo" que permite la expresión en una amplia variedad de tipos de células y tejidos o un promotor, potenciador o promotor/potenciador "específico de células", "específico de tipo de células", "específico de linaje celular" o "específico de tejidos" que permite la expresión en una variedad restringida de tipos de células y tejidos, respectivamente.

Las secuencias de control de la expresión ubicua ilustrativas adecuadas para su uso en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a, un promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), un virus de simio viral 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tarde), un promotor de LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), una LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor del virus del herpes simple (VHS) (timidina cinasa), promotores H5, P7.5, y P11 del virus vaccinia, un promotor del factor de alargamiento 1-alfa (EF1a), respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de iniciación de la traducción eucariota 4A1 (EIF4A1), proteína 5 choque térmico de 70 kDa (HSPA5), proteína de choque térmico beta 90 kDa, miembro 1 (HSP90B1), proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70),  $\beta$ -cinesina ( $\beta$ -KIN), el locus ROSA 26 humano (Irions y otros, Nature Biotechnology 25, 1477 - 1482 (2007)), un promotor de Ubiquitina C (UBC), un promotor de fosfoglicerato cinasa-1 (PGK), un promotor de potenciador de citomegalovirus/actina  $\beta$  de pollo (CAG), un promotor de la  $\beta$ -actina y un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, región de control negativo eliminada, promotor sustituido por sitio de unión al cebador (MND) d1587rev (Challita y otros, J Virol. 69(2):748-55 (1995)).

En una modalidad, un vector comprende un promotor de MND.

En una modalidad, un vector comprende un promotor de EF1a que comprende el primer intrón del gen de EF1a humano.

En una modalidad, un vector comprende un promotor de EF1a que carece del primer intrón del gen de EF1a humano.

En una modalidad particular, puede ser conveniente usar una secuencia de control de expresión específica de célula, tipo de célula, linaje celular o tejido para lograr la expresión específica de tipo celular, específica de linaje o específica de tejido de una secuencia de polinucleótido deseada (por ejemplo, para expresar un ácido nucleico particular que codifica un polipéptido en solo un subconjunto de tipos celulares, linajes celulares o tejidos o durante etapas específicas de desarrollo).

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

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

Los ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles incluyen, pero sin limitarse a, promotores inducibles por esteroides tales como promotores para genes que codifican receptores de glucocorticoides o estrógenos (inducibles mediante el tratamiento con la hormona correspondiente), promotor de metalotionina (inducible mediante tratamiento con varios metales pesados), promotor de MX-1 (inducible por interferón), el sistema regulador de mifepristone "GeneSwitch" (Sirin y otros, 2003, *Gene*, 323:67), el intercambio génico inducible por cumato (WO 2002/088346), sistemas reguladores dependientes de tetraciclina, *etc.* Los agentes inductores incluyen, pero sin limitarse a glucocorticoides, estrógenos, mifepristone (RU486), metales, interferones, moléculas pequeñas, cumato, tetraciclina, doxiciclina, y variantes de los mismos.

La expresión condicional también puede lograrse mediante el uso de una recombinasa de ADN específica de sitio. De acuerdo con ciertas modalidades, el vector comprende al menos un (típicamente dos) sitio(s) para la recombinación mediada por una recombinasa específica de sitio. Como se usa en la presente, los términos "recombinasa" o "recombinasa específica de sitio" incluyen proteínas, enzimas, cofactores de escisión o integradoras o proteínas asociadas que participan en reacciones de recombinación que implican uno o más sitios de recombinación (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, séptimo, diez, doce, quince, veinte, treinta, cincuenta, *etc.*), que pueden ser proteínas de tipo silvestre (*ver* Landy, *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707 (1993)), o mutantes, derivados (por ejemplo, proteínas de fusión que contienen las secuencias de proteínas de recombinación o fragmentos de las mismas), fragmentos, y variantes de los mismos. Los ejemplos ilustrativos de recombinasas adecuadas para su uso en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a: Cre, Int, IHF, Xis, Fli, Fis, Hin, Gin,  $\Phi$ C31, Cin, Tn3 resolvasa, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCEI y ParA.

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

Por ejemplo, un sitio de recombinación para la recombinasa Cre es loxP que es una secuencia de 34 pares de bases que comprende dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases (que sirven como los sitios de unión a la recombinasa) que flanquean una secuencia de núcleo de 8 pares de bases (*ver* la Figura 1 de Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)). Otros sitios loxP ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a: lox511 (Hoess y otros, 1996; Bethke y Sauer, 1997), lox5171 (Lee y Saito, 1998), lox2272 (Lee y Saito, 1998), m2 (Langer y otros, 2002), lox71 (Albert y otros, 1995) y lox66 (Albert y otros, 1995).

Los sitios de reconocimiento adecuados para la recombinasa FLP incluyen, pero sin limitarse a: FRT (McLeod, y otros, 1996), F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> (Schlake y Bode, 1994), F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> (Schlake y Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff y otros, 1988), FRT(RE) (Senecoff y otros, 1988).

Otros ejemplos de secuencias de reconocimiento son las secuencias attB, attP, attL y attR, que son reconocidas por la enzima recombinasa  $\lambda$  Integrasa, por ejemplo, phi-c31. El SSR  $\phi$ C31 media la recombinación solo entre los sitios heterotípicos attB (34 pb de longitud) y attP (39 pb de longitud) (Groth y otros, 2000). attB y attP, denominados por los sitios de unión para la integrasa del fago en los genomas bacteriano y de fago, respectivamente, ambos contienen repeticiones invertidas imperfectas que probablemente se unen por homodímeros de  $\phi$ C31 (Groth y otros, 2000). Los sitios del producto, attL y attR, son efectivamente inertes a la recombinación mediada por  $\phi$ C31 adicional (Belteki y otros, 2003), lo que hace que la reacción sea irreversible. Para catalizar las inserciones, se ha descubierto que el ADN que porta attB se inserta en un sitio genómico de attP más fácilmente que un sitio de attP en un sitio genómico de attB (Thyagarajan y otros, 2001; Belteki y otros, 2003). Por lo tanto, las estrategias típicas se posicionan mediante recombinación homóloga en un "lugar de acoplamiento" que porta attP en un locus definido, que luego se asocia con una secuencia entrante que porta attB para su inserción.

Como se usa en la presente, un "sitio de entrada al ribosoma interno" o "IRES" se refiere a un elemento que promueve la entrada directa al ribosoma interno al codón de iniciación, tal como ATG, de un cistron (una región codificante de proteína), lo que conduce de esta manera la traducción independiente de caperuza del gen. Ver, por ejemplo, Jackson y otros, 1990. Trends Biochem Sci 15(12):477-83) y Jackson y Kaminski. 1995. RNA 1(10):985-1000. Los ejemplos de IRES generalmente empleados por los expertos en la técnica incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos núm. 6,692,736. Otros ejemplos de "IRES" conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitarse a, IRES que puede obtenerse de picornavirus (Jackson y otros, 1990) e IRES que puede obtenerse de fuentes de ARNm virales o celulares, tales como por ejemplo, proteína de unión de cadena pesada de inmunoglobulina (BiP), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Huez y otros 1998. Mol. Cell. Biol. 18(11):6178-6190), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGFII), el factor de iniciación de la traducción eIF4G y los factores de transcripción de levadura TFIIID y HAP4, el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) que está disponible comercialmente en Novagen (Duke y otros, 1992. J. Virol 66(3):1602-9) y el IRES de VEGF (Huez y otros, 1998. Mol Cell Biol 18(11):6178-90). También se ha reportado IRES en genomas virales de especies de Picornaviridae, Dicistroviridae y Flaviviridae y en HCV, virus de la leucemia murina amistosa (FrMLV) y virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV).

En una modalidad, el IRES usado en los polinucleótidos contemplados en la presente descripción es un IRES de EMCV.

En modalidades particulares, los polinucleótidos comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia consenso de Kozak y que codifican un polipéptido deseado. Como se usa en la presente, el término "secuencia de Kozak" se refiere a una secuencia de nucleótidos corta que facilita en gran medida la unión inicial del ARNm a la subunidad pequeña del ribosoma y aumenta la traducción. La secuencia Kozak de consenso es (GCC)RCCATGG (SEQ ID NO:72), donde R es una purina (A o G) (Kozak, 1986. Cell. 44(2):283-92, y Kozak, 1987. Nucleic Acids Res. 15(20):8125-48).

Los elementos que dirigen la terminación y poliadenilación eficientes de los transcritos de ácidos nucleicos heterólogos aumentan la expresión génica heteróloga. Las señales de terminación de la transcripción se encuentran generalmente aguas abajo de la señal de poliadenilación. En modalidades particulares, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que codifica un polipéptido a expresar. El término "sitio poliA" o "secuencia poliA" como se usa en la presente descripción indica una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación del transcrito de ARN naciente por la ARN polimerasa II. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm mediante la adición de una cola de poliA al extremo 3' de la secuencia codificante y, por lo tanto, contribuir a una mayor eficiencia de traducción. La escisión y la poliadenilación se dirigen mediante una secuencia poli(A) en el ARN. La secuencia poli(A) de núcleo para pre-ARNm de mamíferos tiene dos elementos de reconocimiento que flanquean un sitio de escisión-poliadenilación. Típicamente, un hexámero AAUAAA casi invariante se encuentra en 20-50 nucleótidos corriente arriba de un elemento más variable rico en residuos U o GU. La escisión del transcrito naciente se produce entre estos dos elementos y se acopla a la adición de hasta 250 adenosas al producto de escisión 5'. En modalidades particulares, la secuencia poli(A) de núcleo es una secuencia poliA ideal (por ejemplo, AATAAA, ATATAA, AGTAAA). En modalidades particulares, la secuencia poli(A) es una secuencia poliA de SV40, una secuencia poliA de hormona del crecimiento bovina (BGHPA), una secuencia poliA de  $\beta$ -globina de conejo (r $\beta$ gpA), u otra secuencia poliA endógena o heteróloga adecuada conocida en la técnica.

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

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

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



En una modalidad, el marcador de selección positiva y el elemento de selección negativa se unen de manera que la pérdida del elemento de selección negativa necesariamente también se acompaña de la pérdida del marcador de selección positiva. En una modalidad particular, los marcadores de selección positiva y negativa se fusionan de manera que la pérdida de uno conduce obligatoriamente a la pérdida del otro. Un ejemplo de un polinucleótido fusionado que produce como producto de expresión un polipéptido que confiere las características de selección positiva y negativa deseadas descritas anteriormente es un gen de fusión de la higromicina fosfotransferasa timidina cinasa (HyTK). La expresión de este gen produce un polipéptido que confiere resistencia a higromicina B para la selección positiva *in vitro*, y sensibilidad al ganciclovir para la selección negativa *in vivo*. Ver también las publicaciones de PCT US91/08442 y PCT/US94/05601, por S. D. Lupton, que describen el uso de genes de fusión de selección bifuncional derivados de la fusión de marcadores de selección positiva dominantes con marcadores de selección negativa.

Los marcadores de selección positiva preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en hph, nco y gpt, y los marcadores de selección negativa preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en citosina desaminasa, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT y gpt. Los genes de fusión de selección bifuncional ilustrativos contemplados en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a, genes en donde el marcador de selección positiva se deriva de hph o neo, y el marcador de selección negativa se deriva de citosina desaminasa o un gen de TK o marcador de selección.

En modalidades particulares, los polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos, o polipéptidos de fusión pueden introducirse en células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, mediante métodos no virales y virales. En modalidades particulares, el suministro de uno o más polinucleótidos puede proporcionarse por el mismo método o por diferentes métodos, y/o por el mismo vector o por diferentes vectores.

El término "vector" se usa en la presente descripción para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido se une generalmente a, por ejemplo, se inserta en la molécula de ácido nucleico vectorial. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma en una célula, o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula huésped. En modalidades particulares, los vectores no virales se usan para suministrar uno o más polinucleótidos contemplados en la presente descripción a una célula T.

Los ejemplos ilustrativos de vectores no virales incluyen, pero sin limitarse a plásmidos (por ejemplo, plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, cósmidos y cromosomas artificiales bacterianos.

Los métodos ilustrativos de suministro no viral de polinucleótidos contemplados en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a: electroporación, sonoporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, nanopartículas, conjugados de polimerización o lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, transferencia mediada por DEAE-dextrano, pistola génica y choque térmico.

Los ejemplos ilustrativos de sistemas de suministro de polinucleótidos adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a, los proporcionados por Amax Biosystems, Maxcyte, Inc., BTX Molecular Delivery Systems, y Copernicus Therapeutics Inc. Los reactivos de lipofección se venden comercialmente (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para la lipofección eficiente de reconocimiento de receptores de polinucleótidos se han descrito en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Liu y otros (2003) Gene Therapy. 10:180-187; y Balazs y otros (2011) Journal of Drug Delivery. 2011:1-12. El suministro dirigido a anticuerpos, derivado de bacterias, basado en nanocélulas no vivas también se contempla en modalidades particulares.

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

Los vectores virales que comprenden variantes de nucleasas y/o plantillas de reparación donantes pueden administrarse directamente a un organismo para la transducción de células *in vivo*. Alternativamente, puede administrarse ADN desnudo. La administración se realiza por cualquiera de las vías normalmente usadas para introducir una molécula en contacto final con células sanguíneas o tisulares que incluyen, pero sin limitarse a, inyección, infusión, aplicación tópica y electroporación. Los métodos adecuados para administrar tales ácidos nucleicos están disponibles y son bien conocidos por los expertos en la técnica, y, aunque puede usarse más de una ruta para administrar una composición particular, una ruta particular frecuentemente puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta.

Los ejemplos ilustrativos de sistemas de vectores virales adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a, virus adenoasociado (AAV), retrovirus, virus

del herpes simple, adenovirus y vectores del virus vaccinia.

En varias modalidades, uno o más polinucleótidos se introducen en una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, células T, al transducir la célula con un virus adenoasociado recombinante (rAAV), que comprende el uno o más polinucleótidos.

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

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

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

La construcción de vectores de rAAV, producción y purificación de los mismos se han descrito, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núms. 9,169,494; 9,169,492; 9,012,224; 8,889,641; 8,809,058; y 8,784,799.

En varias modalidades, uno o más polinucleótidos se introducen en una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, células T, al transducir la célula con un retrovirus, por ejemplo, lentivirus, que comprende el uno o más polinucleótidos.

Como se usa en la presente, el término "retrovirus" se refiere a un virus de ARN que transcribe inversamente su ARN genómico en una copia lineal de ADN bicatenario y posteriormente integra covalentemente su ADN genómico en un genoma huésped. Los retrovirus ilustrativos adecuados para su uso en modalidades particulares incluyen, pero sin limitarse a: virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV), virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamífero murino (MuMTV), virus de la leucemia del simio gibón (GaLV), virus de la leucemia felina (FLV), spumavirus, virus de la leucemia murina de Friend, virus de las células madre murinas (MSCV) y virus del sarcoma de Rous (RSV)) y lentivirus.

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

En varias modalidades, un vector lentiviral contemplado en la presente descripción comprende uno o más LTR, y uno o más, o todos, de los siguientes elementos accesorios: una cPPT/FLAP, una señal de empaque Psi ( $\Psi$ ), un elemento de exportación, secuencias poli (A), y puede comprender opcionalmente un WPRE o HPRE, un elemento aislante, un marcador de selección y un gen de suicidio celular, como se describe en otra parte de la presente descripción.

En modalidades particulares, los vectores lentivirales contemplados en la presente descripción pueden ser lentivirus de integración o no integración o con integración defectuosa. Como se usa en la presente, el término "lentivirus con integración defectuosa" o "IDLV" se refiere a un lentivirus que tiene una integrasa que carece de la capacidad de integrar el genoma viral en el genoma de las células huésped. Los vectores virales incompetentes de integración se han descrito en la solicitud de patente WO 2006/010834.

Las mutaciones ilustrativas en el gen de pol de HIV-1 adecuadas para reducir la actividad de la integrasa incluyen, pero sin limitarse a: H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199c, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A y K264H.

El término "repetición terminal larga (LTR)" se refiere a dominios de pares de bases ubicados en los extremos de ADN retrovirales que, en su contexto de secuencia natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5.

Como se usa en la presente, el término "elemento FLAP" o "cPPT/FLAP" se refiere a un ácido nucleico cuya secuencia incluye el tracto de polipurina central y secuencias de terminación central (cPPT y CTS) de un retrovirus, por ejemplo, HIV-1 o HIV-2. Los elementos FLAP adecuados se describen en la patente de Estados Unidos núm. 6,682,907 y en Zennou, y otros, 2000, *Cell*, 101: 173.

Como se usa en la presente, el término "señal de empaquetamiento" o "secuencia de empaquetamiento" se refiere a secuencias psi [ $\Psi$ ] ubicadas dentro del genoma retroviral que se requieren para la inserción del ARN viral en la cápside o partícula viral, ver por ejemplo, Clever y otros, 1995. *J. of Virology*, Vol. 69, No. 4; págs. 2101-2109.

La expresión "elemento de exportación" se refiere a un elemento regulador postranscripcional de acción cis que regula el transporte de un transcrito de ARN desde el núcleo hasta el citoplasma de una célula. Los ejemplos de elementos de exportación de ARN incluyen, pero sin limitarse a, el elemento de respuesta rev (RRE) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (ver, por ejemplo, Cullen y otros, 1991. *J. Virol.* 65: 1053; y Cullen y otros, 1991. *Cell* 58: 423) y el elemento regulador postranscripcional (HPRE) del virus de la hepatitis B.

En modalidades particulares, la expresión de secuencias heterólogas en vectores virales aumenta al incorporar elementos reguladores postranscripcionales, sitios de poliadenilación eficientes y, opcionalmente, señales de terminación de la transcripción en los vectores. Una variedad de elementos reguladores postranscripcionales puede aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo en la proteína, por ejemplo, un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE; Zufferey y otros, 1999, *J. Virol.*, 73:2886); el elemento regulador postranscripcional presente en el virus de la hepatitis B (HPRE) (Huang y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864); y similares (Liu y otros, 1995, *Genes Dev.*, 9:1766).

Los vectores lentivirales contienen preferentemente varias mejoras de seguridad como resultado de modificar las LTR. Los vectores "de autoinactivación" (SIN) se refieren a vectores con replicación defectuosa, por ejemplo, vectores retrovirales o lentivirales, en los que la región derecha (3') potenciadora-promotora de LTR, conocida como la región U3, se ha modificado (por ejemplo, por eliminación o sustitución) para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. La autoinactivación se logra preferentemente mediante la introducción de una eliminación en la región U3 de la 3' LTR del ADN vectorial, es decir, el ADN usado para producir el ARN vectorial. Por lo tanto, durante la transcripción inversa, esta eliminación se transfiere a la 5' LTR del ADN proviral. En modalidades particulares, es conveniente eliminar suficiente cantidad de la secuencia U3 para disminuir o anular en gran medida la actividad transcripcional de la LTR, disminuyendo o anulando de esta manera en gran medida la producción de ARN vectorial de longitud completa en células transducidas. En el caso de lentivectores basados en VIH, se ha descubierto que tales vectores toleran eliminaciones significativas de U3, incluida la eliminación de la caja TATA de LTR (por ejemplo, eliminaciones de -418 a -18), sin reducciones significativas en los títulos de vectores.

Se proporciona una mejora de seguridad adicional reemplazando la región U3 de la 5' LTR con un promotor heterólogo para impulsar la transcripción del genoma viral durante la producción de partículas virales. Los ejemplos de promotores heterólogos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, promotores del virus de simio viral 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, inmediato temprano), virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus del sarcoma de Rous (RSV) y virus del herpes simple (HSV) (timidina cinasa).

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

En ciertas modalidades, los vectores lentivirales se producen de acuerdo con métodos conocidos. Ver, por ejemplo, Kutner y otros, *BMC Biotechnol.* 2009;9:10. doi: 10.1186/1472-6750-9-10; Kutner y otros *Nat. Protoc.* 2009;4(4):495-505. doi: 10.1038/nprot.2009.22.

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

En varias modalidades, uno o más polinucleótidos se introducen en una célula efectora inmunitaria, mediante la transducción de la célula con un adenovirus que comprende el uno o más polinucleótidos.

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

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

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

En varias modalidades, uno o más polinucleótidos se introducen en una célula efectora inmunitaria al transducir la célula con un virus del herpes simple, por ejemplo, HSV-1, HSV-2, que comprende el uno o más polinucleótidos.

El virión maduro de VHS consiste en una cápsula icosaédrica envuelta con un genoma viral que consiste en una molécula de ADN lineal bicatenario que es de 152 kb. En una modalidad, el vector viral basado en HSV es deficiente en uno o más genes de HSV esenciales o no esenciales. En una modalidad, el vector viral basado en HSV tiene deficiencia en la replicación. La mayoría de los vectores de HSV con deficiencia en la replicación contienen una eliminación para eliminar uno o más genes de HSV intermedios-tempranos, tempranos o tardíos para evitar la replicación. Por ejemplo, el vector de HSV puede ser deficiente en un gen temprano inmediato seleccionado del grupo que consiste en: ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 y sus combinaciones. Las ventajas del vector de HSV son su capacidad para entrar en una etapa latente que puede dar como resultado la expresión de ADN a largo plazo y su gran genoma de ADN viral que puede acomodar insertos de ADN exógenos de hasta 25 kb. Los vectores basados en HSV se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 5,837,532, 5,846,782 y 5,804,413, y las Solicitudes de Patente Internacional WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637 y WO 99/06583.

#### G. Células modificadas genéticamente

En varias modalidades, las células se modifican para expresar polipéptidos conversores de señal de TGF $\beta$ , CTBR, TCR modificados genéticamente, CAR, DARIC, zetacinas y proteínas de fusión contempladas en la presente descripción, para su uso en el tratamiento del cáncer. Las células pueden modificarse no genéticamente para expresar los polipéptidos contemplados en la presente descripción, o en particular las modalidades preferidas, las células pueden modificarse genéticamente para expresar los polipéptidos contemplados en la presente descripción. Como se usa en la presente, el término "manipulado genéticamente" o "modificado genéticamente" se refiere a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula. Los términos, "células modificadas genéticamente", "células modificadas" y "células redirigidas", se usan indistintamente en modalidades particulares.

En modalidades particulares, los polipéptidos conversores de señal de CTBR contemplados en la presente descripción se introducen y expresan en células efectoras inmunitarias para mejorar la resistencia de las células a las señales inmunosupresoras en el TME mediado por TGF $\beta$ . En modalidades particulares, los polipéptidos conversores de señal CTBR se introducen y expresan en células efectoras inmunitarias que se han redirigido a una célula diana en virtud de la coexpresión de un receptor de antígeno modificado genéticamente en la célula.

Una "célula efectora inmunitaria", es cualquier célula del sistema inmunitario que tenga una o más funciones efectoras (por ejemplo, actividad de destrucción de células citotóxicas, secreción de citocinas, inducción de ADCC y/o CDC). Las células efectoras inmunitarias ilustrativas contempladas en la presente descripción son linfocitos T, en particular células T citotóxicas (CTL; células T CD8+), TIL y células T auxiliares (HTL; células T CD4+. En una modalidad, las células efectoras inmunitarias incluyen células asesinas naturales (NK). En una modalidad, las células efectoras inmunitarias incluyen células T asesinas naturales (NKT). Las células efectoras inmunitarias pueden ser autólogas/autogénicas ("propias") o no autólogas ("no propias", por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas).

"Autólogas", como se usa en la presente, se refiere a células del mismo sujeto. "Alogénicas", como se usa en la presente, se refiere a células de la misma especie que difieren genéticamente de la célula en comparación. "Singénicas", como se usa en la presente, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación. "Xenogénicas", como se usa en la presente, se refiere a células de una especie diferente a la célula en comparación. En modalidades preferidas, las células son autólogas.

Las células efectoras inmunitarias ilustrativas adecuadas para introducir los polipéptidos conversores de señal de CTBR contemplados en la presente descripción incluyen linfocitos T. Los términos "células T" o "linfocitos T" son reconocidos en la técnica y están destinados a incluir timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo o linfocitos T activados. Una célula T puede ser una célula T auxiliar (Th), por ejemplo una célula T auxiliar 1 (Th1) o T auxiliar 2 (Th2). La célula T puede ser una célula T auxiliar (HTL; célula T CD4<sup>+</sup>) célula T CD4<sup>+</sup>, una célula T citotóxica (CTL; célula T CD8<sup>+</sup>), célula T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, célula T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> o cualquier otro subconjunto de células T. Otras poblaciones ilustrativas de células T adecuadas para su uso en modalidades particulares incluyen células T vírgenes y células T de memoria.

Como entenderá el experto en la técnica, otras células también pueden usarse como células efectoras inmunitarias con polipéptidos conversores de señal de CTBR contemplados en la presente descripción. En particular, las células efectoras inmunitarias también incluyen células NK, células NKT, neutrófilos y macrófagos. Las células efectoras inmunitarias también incluyen progenitoras de células efectoras en donde tales células progenitoras pueden inducirse para diferenciarse en células efectoras inmunitarias *in vivo* o *in vitro*. Por lo tanto, en modalidades particulares, la célula efectora inmunitaria incluye progenitoras de células efectoras inmunitarias tales como células madre hematopoyéticas (HSC) contenidas dentro de la población CD34<sup>+</sup> de células derivadas de sangre de cordón, médula ósea o sangre periférica movilizada que tras la administración en un sujeto se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras, o que pueden inducirse *in vitro* para diferenciarse en células efectoras inmunitarias maduras.

Como se usa en la presente, las células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente para contener un receptor quimérico específico pueden denominarse "células efectoras inmunitarias redirigidas específicas de antígeno".

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

En modalidades particulares se proporcionan métodos para producir las células efectoras inmunitarias que expresan un polipéptido conversor de señal de TGFβ contemplado en la presente descripción. En una modalidad, el método comprende transfectar o transducir células efectoras inmunitarias aisladas de un individuo de manera que las células efectoras inmunitarias expresen uno o más polipéptidos conversores de señal de TGFβ como se contempla en la presente descripción. En una modalidad, el método comprende transfectar o transducir células efectoras inmunitarias aisladas de un individuo de manera que las células efectoras inmunitarias expresen uno o más polipéptidos conversores de señal de TGFβ y receptores de antígeno modificados genéticamente contemplados en la presente descripción. En ciertas modalidades, las células efectoras inmunitarias se aíslan de un individuo y se modifican genéticamente sin manipulación adicional *in vitro*. Tales células pueden entonces volver a administrarse directamente a la persona. En modalidades adicionales, las células efectoras inmunitarias se activan y estimulan primero para proliferar *in vitro* antes de modificarse genéticamente. Con respecto a esto, las células efectoras inmunitarias pueden cultivarse antes y/o después de modificarse genéticamente.

En modalidades particulares, antes de la manipulación o modificación genética *in vitro* de las células efectoras inmunitarias descritas en la presente descripción, la fuente de células se obtiene de un sujeto. En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias modificadas comprenden células T.

Las células T pueden obtenerse a partir de una serie de fuentes que incluyen, pero sin limitarse a, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En ciertas modalidades, las células T pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre recolectada de un sujeto mediante el uso de cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como la sedimentación, por ejemplo, separación con FICOLL™.

En otras modalidades, se usa una población aislada o purificada de células T. En algunas modalidades, después del aislamiento de PBMC, tanto los linfocitos T citotóxicos como los auxiliares pueden clasificarse en subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y efectoras ya sea antes o después de la activación, expansión y/o modificación genética.

En una modalidad, una población aislada o purificada de células T expresa uno o más de los marcadores que incluyen, pero sin limitarse a, un CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, o sus combinaciones

En ciertas modalidades, las células T se aíslan de un individuo y se activan y estimulan primero para proliferar *in vitro* antes de modificarse para expresar un polipéptido conversor de señal de TGFβ.

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

generalmente mediante el uso de métodos como se describió, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; y 6,867,041. En modalidades particulares, las células T se activan y expanden por alrededor de 6 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 18 horas o alrededor de 24 horas antes de la introducción de vectores o polinucleótidos que codifican los polipéptidos conversores de señal de TGFβ. Opcionalmente, en combinación con un receptor de antígeno modificado genéticamente contemplado en la presente descripción.

En una modalidad, las células T se activan al mismo tiempo que se modifican.

En varias modalidades, un método para generar una célula efectora inmunitaria comprende activar una población de células que comprenden células T y expandir la población de células T. La activación de los linfocitos T puede lograrse al proporcionar una señal de estimulación primaria a través del complejo TCR/CD3 de células T y al proporcionar una señal de coestimulación secundaria a través de una molécula accesorio, por ejemplo, CD28.

El complejo TCR/CD3 puede estimularse al poner en contacto la célula T con un agente de unión a CD3 adecuado, por ejemplo, un ligando de CD3 o un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los ejemplos ilustrativos de anticuerpos contra CD3 incluyen, pero sin limitarse a, OKT3, G19-4, BC3 y 64. 1.

Además de la señal de estimulación primaria proporcionada a través del complejo TCR/CD3, la inducción de las respuestas de las células T requiere una segunda señal coestimuladora. En modalidades particulares, puede usarse un agente de unión a CD28 para proporcionar una señal coestimuladora. Los ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD28 incluyen, pero sin limitarse a: ligandos de CD 28 naturales, por ejemplo, un ligando natural para CD28 (por ejemplo, un miembro de la familia de proteínas B7, tales como B7-1(CD80) y B7-2 (CD86); y anticuerpo monoclonal anti-CD28 o fragmento de este capaz de reticular la molécula de CD28, por ejemplo, anticuerpos monoclonales 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2 y EX5.3D10.

En una modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 y la molécula coestimuladora se acoplan a la misma superficie.

En ciertas modalidades, los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras se localizan en la superficie de una célula. Esto puede lograrse mediante la transfección o transducción de una célula con un ácido nucleico que codifica al agente unión en una forma adecuada para su expresión en la superficie celular o alternativamente por acoplamiento de un agente de unión a la superficie celular. En otra modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 y la molécula coestimuladora se muestran en el antígeno presentadores de células.

En una modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 y la molécula coestimuladora se proporcionan en superficies separadas.

En una modalidad determinada, uno de los agentes de unión que proporciona señales estimuladoras y coestimuladoras es soluble (proporcionado en solución) y el(los) otro(s) agente(s) se proporciona(n) en una o más superficies.

En una modalidad particular, los agentes aglutinantes que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras se proporcionan en una forma soluble (proporcionada en solución).

En varias modalidades, los métodos para producir células T contempladas en la presente descripción comprenden activar células T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

En una modalidad, la expansión de células T activadas por los métodos contemplados en la presente descripción comprende además cultivar una población de células que comprenden células T durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 7 días a aproximadamente 28 días o cualquier valor entero por hora intermedio. En otra modalidad, la composición de células T puede cultivarse durante 14 días. En una modalidad particular, las células T se cultivan durante alrededor de 21 días. En otra modalidad, las composiciones de células T se cultivan durante alrededor de 2-3 días. También pueden ser convenientes varios ciclos de estimulación/activación/expansión de manera que el tiempo de cultivo de células T pueda ser de 60 días o más.

En modalidades particulares, las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, Medios Esenciales Mínimos o Medios RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) y uno o más factores necesarios para la proliferación y viabilidad que incluyen, pero sin limitarse al suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-γ, IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ y TNF-α o cualquier otro aditivo adecuado para el crecimiento de células conocidas por el experto en la técnica.

Otros ejemplos ilustrativos de medios de cultivo celular incluyen, pero sin limitarse a, RPMI 1640, Clicks, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o complementado con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de células T.

Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomycin, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura y atmósfera apropiadas (por ejemplo, 37 °C) (por ejemplo, aire más 5 % de CO<sub>2</sub>).

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

En otras modalidades, las células APC artificiales (aAPC) producidas mediante la modificación genética de las células K562, U937, 721.221, T2 y C1R para dirigir la expresión y secreción estables, de una variedad de moléculas y citocinas coestimuladoras. En una modalidad particular se usan aAPC K32 o U32 para dirigir la visualización de una o más moléculas estimuladoras basadas en anticuerpos en la superficie celular de aAPC. Las poblaciones de células T pueden expandirse mediante aAPC que expresan una variedad de moléculas coestimuladoras que incluyen, pero sin limitarse a, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) y/o CD80 o CD86. Finalmente, las aAPC proporcionan una plataforma eficiente para expandir células T modificadas genéticamente y mantener la expresión de CD28 en células T CD8. Las aAPC proporcionadas en los documentos WO 03/057171 y US2003/0147869.

En una modalidad particular, el polinucleótido que codifica un convertidor de señal de TGFβ y un receptor de antígeno modificado genéticamente se introducen en la población de células T. En una modalidad particular, el polinucleótido que codifica un convertidor de señal de TGFβ se introduce en una población de células T que expresan un receptor de antígeno modificado genéticamente. Los polinucleótidos pueden introducirse en las células T mediante microinyección, transfección, lipofección, choque térmico, electroporación, transducción, pistola génica, microinyección, transferencia mediada por DEAE-dextrano, y similares.

En una modalidad preferida, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción viral.

Los ejemplos ilustrativos de sistemas de vectores virales adecuados para introducir un polinucleótido en una célula efectora inmunitaria o una célula CD34<sup>+</sup> incluyen, pero sin limitarse a, virus adenoasociado (AAV), retrovirus, virus del herpes simple, adenovirus, vectores del virus vaccinia para la transferencia génica.

En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción de AAV.

En una modalidad, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción retroviral.

En la invención reivindicada, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción lentiviral.

En una modalidad (no de acuerdo con la invención reivindicada), los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción de adenovirus.

En una modalidad, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción del virus del herpes simple.

En una modalidad, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción del virus vaccinia.

#### H. Composiciones y formulaciones

Las composiciones contempladas en la presente descripción pueden comprender uno o más polipéptidos, polinucleótidos, vectores que comprenden células efectoras inmunitarias iguales, modificadas genéticamente, *etc.* Las composiciones incluyen, pero sin limitarse a, composiciones farmacéuticas. Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición formulada en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para la administración a una célula o un animal, ya sea sola o en combinación con una o más modalidades de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones también pueden administrarse en combinación con otros agentes, tales como, por ejemplo, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas, quimioterapéuticos, profármacos, fármacos, anticuerpos u otros diversos agentes farmacéuticamente activos. Prácticamente no hay límite a otros componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre y cuando los agentes adicionales no afecten negativamente la capacidad de la composición para suministrar la terapia prevista.

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

alérgica u otro problema o proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administran los polipéptidos, polinucleótidos, vectores que comprenden los mismos, o células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente. Los ejemplos ilustrativos de portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como medios de cultivo celular, agua y aceites, que incluyen los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados en modalidades particulares incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Los ingredientes activos complementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

En una modalidad, una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable es adecuada para la administración a un sujeto. En modalidades particulares, una composición que comprende un portador es adecuada para la administración parenteral, por ejemplo, administración intravascular (intravenosa o intraarterial), intraperitoneal o intramuscular. En modalidades particulares, una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable es adecuada para la administración intraarticular, intraespinal o intratecal. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles, medios de cultivo celular o dispersiones. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los polipéptidos, polinucleótidos, vectores que comprenden los mismos, o células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

En modalidades particulares, las composiciones contempladas en la presente descripción comprenden células T modificadas genéticamente y un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición que comprende una composición a base de células contemplada en la presente descripción puede administrarse por separado mediante métodos de administración entérica o parenteral o en combinación con otros compuestos adecuados para efectuar los objetivos de tratamiento deseados.

El portador farmacéuticamente aceptable debe ser de pureza suficientemente alta y de toxicidad suficientemente baja para hacerlo adecuado para la administración al sujeto humano que se está tratando. Además, debe mantener o aumentar la estabilidad de la composición. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la forma prevista de administración en mente, para proporcionar el volumen, consistencia, etc. deseados, cuando se combina con otros componentes de la composición. Por ejemplo, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser, sin limitación, un agente aglutinante (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.), un relleno (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos, fosfato de hidrógeno de calcio, etc.) un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicol, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.) un desintegrante (por ejemplo, almidón, almidón glicolato de sodio, etc.), o un agente humectante (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.). Otros portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para las composiciones contempladas en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatinas, amilosas, estearatos de magnesio, talcos, ácidos silícicos, parafinas viscosas, hidroximetilcelulosas, polivinilpirrolidonas y similares.

Tales soluciones portadoras también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. El término "tampón", como se usa en la presente descripción, se refiere a una solución o líquido cuya estructura química neutraliza ácidos o bases sin un cambio significativo en el pH. Los ejemplos de tampones contemplados en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco, solución de Ringer, dextrosa al 5 % en agua (D5W), solución salina normal/fisiológica (NaCl al 0,9 %).

Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden estar presentes en cantidades suficientes para mantener un pH de la composición de alrededor de 7. Alternativamente, la composición tiene un pH en un intervalo de alrededor de 6,8 a alrededor de 7,4, por ejemplo, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 y 7,4. En aún otra modalidad, la composición tiene un pH de alrededor de 7,4.

Las composiciones contempladas en la presente descripción pueden comprender un medio farmacéuticamente aceptable no tóxico. Las composiciones pueden ser una suspensión. El término "suspensión", como se usa en la presente descripción, se refiere a condiciones no adherentes en las que las células no se unen a un soporte sólido. Por ejemplo, las células mantenidas como una suspensión pueden revolverse o agitarse y no se adhieren a un soporte, tal como una placa de cultivo.

En modalidades particulares, las composiciones contempladas en la presente descripción se formulan en una



suspensión, donde las células T modificadas se dispersan dentro de un medio o solución líquida aceptable, por ejemplo, medio sin solución salina o suero, en una bolsa intravenosa (IV) o similar. Los diluyentes aceptables incluyen, pero sin limitarse a, agua, PlasmaLyte, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónica (solución salina), medio de cultivo celular libre de suero y medio adecuado para el almacenamiento criogénico, por ejemplo, medio Criostor®.

En ciertas modalidades, un portador farmacéuticamente aceptable está sustancialmente libre de proteínas naturales de origen humano o animal, y es adecuado para almacenar una composición que comprende una población de células T modificadas. La composición terapéutica pretende administrarse a un paciente humano, y por lo tanto está sustancialmente libre de componentes de cultivo celular tales como albúmina sérica bovina, suero de caballo y suero fetal bovino.

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

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

Los ejemplos ilustrativos de medios libres de suero usados en composiciones particulares incluyen, pero sin limitarse a, QBSF- 60 (Quality Biological, Inc.), StemPro-34 (Life Technologies) y X-VIVO 10.

En una modalidad preferida, las composiciones que comprenden células T modificadas se formulan en PlasmaLyte.

En varias modalidades, las composiciones que comprenden células T modificadas se formulan en un medio de crioconservación. Por ejemplo, los medios de crioconservación con agentes de crioconservación pueden usarse para mantener un resultado de alta viabilidad celular después de la descongelación. Los ejemplos ilustrativos de medios de crioconservación usados en composiciones particulares incluyen, pero sin limitarse a, crioStor CS10, CrioStor CS5 y CrioStor CS2.

En una modalidad, las composiciones se formulan en una solución que comprende 50:50 de PlasmaLyte A con respecto a crioStor CS10.

En modalidades particulares, la composición está sustancialmente libre de micoplasma, endotoxina y contaminación microbiana. Por "esencialmente libre" con respecto a la endotoxina se entiende que hay menos endotoxina por dosis de células de la permitida por la FDA para un producto biológico, que es una endotoxina total de 5 EU/kg de peso corporal por día, que para una persona promedio de 70 kg es 350 EU por dosis total de células. En modalidades particulares, las composiciones que comprenden células madre o progenitoras hematopoyéticas transducidas con un vector retroviral contemplado en la presente descripción contienen alrededor de 0,5 EU/ml a alrededor de 5,0 EU/ml, o alrededor de 0,5 EU/ml, 1,0 EU/ml, 1,5 EU/ml, 2,0 EU/ml, 2,5 EU/ml, 3,0 EU/ml, 3,5 EU/ml, 4,0 EU/ml, 4,5 EU/ml o 5,0 EU/ml.

En modalidades particulares, la formulación de soluciones portadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la técnica, al igual que el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en la presente descripción en una variedad de regímenes de tratamiento, que incluye, por ejemplo, administración entérica y parenteral, por ejemplo, intravascular, intravenosa, intrarterial, intraósea, intraventricular, intracerebral, intracranial, intraespinal, intratecal e intramedular y formulación. El experto en la técnica entenderá que las modalidades particulares contempladas en la presente descripción pueden comprender otras formulaciones, tales como las que se conocen bien en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, volumen I y volumen II. 22da Edición. Editado por Loyd V. Allen Jr. Filadelfia, PA: Pharmaceutical Press; 2012.

En modalidades particulares, las composiciones comprenden una cantidad de células efectoras inmunitarias, que incluyen células T CAR, que expresan un conversor de señal de CTBR contemplado en la presente descripción. Como se usa en la presente, el término "cantidad" se refiere a "una cantidad efectiva" o "una cantidad efectiva" de células que comprenden un conversor de señal de CTBR contemplado en la presente descripción, *etc.*, para lograr un resultado profiláctico o terapéutico beneficioso o deseado, que incluye resultados clínicos.

Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad de células que comprenden un conversor de señal de CTBR contemplado en la presente descripción, *etc.*, efectivo para lograr el resultado profiláctico deseado.

Típicamente pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva es menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de células que comprenden un conversor de señal de CTBR contemplado en la presente descripción que es efectivo para "tratar" a un sujeto (por ejemplo, un paciente). Cuando se indica una cantidad terapéutica, la cantidad precisa de las composiciones que se administrarán puede determinarse por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales entre edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y afección del paciente (sujeto). Generalmente puede indicarse que una composición farmacéutica que comprende las células efectoras inmunitarias descritas en la presente descripción puede administrarse a una dosificación de  $10^2$  a  $10^{10}$  células/kg de peso corporal, preferentemente de  $10^5$  a  $10^6$  células/kg de peso corporal, que incluye todos los valores enteros dentro de esos intervalos. El número de células dependerá del uso final para el que se destina la composición al igual que el tipo de células incluidas en la misma. Para los usos proporcionados en la presente descripción, las células están generalmente en un volumen de un litro o menos, pueden ser de 500 mL o menos, incluso 250 mL o 100 mL o menos. Por lo tanto, la densidad de las células deseadas es típicamente mayor que  $10^5$  células/mL y generalmente es mayor que  $10^7$  células/mL, generalmente  $10^8$  células/mL o mayor. El número clínicamente relevante de células inmunitarias puede dividirse en múltiples infusiones que de manera acumulativa sean iguales o superen  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  o  $10^{12}$  células. En algunas modalidades, particularmente dado que todas las células infundidas se redirigirán a un antígeno diana particular, pueden administrarse cantidades menores de células, en el intervalo de  $10^6$ /kilogramo ( $10^6$ - $10^{11}$  por paciente). Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (por ejemplo, PHA) o linfocinas, citocinas y/o quimiocinas (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF-alfa, IL-18 y TNF-beta, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 $\alpha$ , etc.) como se describe en la presente descripción para potenciar la inducción de la respuesta inmunitaria.

Generalmente, las composiciones que comprenden las células activadas y expandidas como se describe en la presente descripción pueden utilizarse en el tratamiento y prevención de enfermedades que surgen en personas que están inmunodeprimidas. En particular, las composiciones contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento del cáncer. En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias pueden administrarse solas o como composiciones farmacéuticas en combinación con portadores, diluyentes, excipientes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares.

En modalidades particulares, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad de células T modificadas genéticamente, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables.

En una modalidad particular, las composiciones comprenden una cantidad efectiva de células efectoras inmunitarias que comprenden un conversor de señal de CTBR contemplado en la presente descripción, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos, tales como terapia de radiación, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con antibióticos. Tales agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para un estado de enfermedad particular como se describe en la presente descripción, tal como un cáncer particular. Los agentes terapéuticos ilustrativos contemplados incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, NSAID, DMARD, antiinflamatorios, quimioterapéuticos, radioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos u otros agentes activos y auxiliares.

En ciertas modalidades, las composiciones que comprenden células efectoras inmunitarias que comprenden un conversor de señal de CTBR contemplado en la presente descripción pueden administrarse junto con cualquier número de agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos ilustrativos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN<sup>TM</sup>); sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquena, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosfo-ramida, trietilfosfofosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, cloronaftazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como alacinomicinas, actinomicina, au-tramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinamicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, mar-celomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico tal como ácido frolico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; el- formitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracino; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK<sup>®</sup>; razoxano; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazonico; triazicuona;

2, 2',2"-trichlorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); derivados del ácido retinoico tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileucina difitox); esperamicinas; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre cánceres tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

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

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

Ejemplos ilustrativos de anticuerpos terapéuticos adecuados para la combinación con las células T modificadas que comprenden un conversor de señal de CTBR contemplado en la presente descripción, incluyen, pero sin limitarse a, bavituximab, bevacizumab (avastina), bivatuzumab, blinatumomab, conatumumab, daratumumab, duligotumab, dacetuzumab, dalotuzumab, elotuzumab (HuLuc63), gemtuzumab, ibritumomab, indatuximab, inotuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, milatuzumab, moxetuzumab, ocaratuzumab, ofatumumab, rituximab, siltuximab, teprotumumab y ublituximab.

En ciertas modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción se administran junto con una citocina. Por "citocina" como se usa en la presente se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas del crecimiento tales como la hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano con N-metionilo, y hormona del crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como la hormona estimulante de folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora muleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1alpha, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando del kit (KL). Como se usa en la presente, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante, y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativas.

#### I. Métodos terapéuticos

Las células efectoras inmunitarias, que incluyen las células T CAR, que comprenden un CTBR contemplada en la presente descripción proporcionan métodos mejorados de inmunoterapia adoptiva para su uso en la prevención, el

tratamiento y el alivio de cánceres, o para prevenir, tratar o mejorar al menos un síntoma asociado con un cáncer.

Las células efectoras inmunitarias que comprenden un receptor modificado genéticamente y un CTBR contemplada en la presente descripción proporcionan productos farmacológicos mejorados para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de al menos un síntoma de un cáncer, GVHD, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria o una inmunodeficiencia. Como se usa en la presente, el término "producto farmacéutico" se refiere a células modificadas producidas mediante el uso de las composiciones y métodos contemplados en la presente descripción. En modalidades particulares, el producto farmacéutico comprende células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente, células T que comprenden un receptor modificado genéticamente, o células T CAR modificadas adicionalmente para expresar un conversor de señal de CTBR. Además, las células T modificadas contempladas en modalidades particulares proporcionan terapias celulares adoptivas más seguras y eficaces porque son resistentes al agotamiento de células T y muestran una mayor durabilidad y persistencia en el microentorno tumoral que puede conducir a una terapia sostenida.

En modalidades particulares, una cantidad efectiva de células efectoras inmunitarias modificadas o células T que comprenden un receptor modificado genéticamente y un conversor de señal de CTBR se administran a un sujeto para prevenir, tratar o mejorar al menos un síntoma de un cáncer, GVHD, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria o una inmunodeficiencia.

En modalidades particulares, una cantidad efectiva de células efectoras inmunitarias modificadas o células T que comprenden un conversor de señal de CTBR y un TCR modificado genéticamente, CAR, o Daric, u otro transgén terapéutico para su uso en un método para prevenir, tratar o mejorar al menos un síntoma de un cáncer comprende administrar al sujeto la cantidad efectiva de células efectoras inmunitarias modificadas o células T que comprenden un conversor de señal de CTBR y un TCR modificado genéticamente, CAR, o Daric, u otro transgén terapéutico para redirigir las células a un tumor o cáncer. Las células modificadas genéticamente son un producto farmacéutico más duradero y persistente porque las células son más resistentes a las señales inmunosupresoras del microentorno tumoral en virtud de la conversión de una señal inmunosupresora de TGF $\beta$  en una señal inmunoestimuladora.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de tumores sólidos o cánceres.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de tumores sólidos o cánceres que incluyen, pero sin limitarse a: cáncer de la glándula suprarrenal, carcinoma corticosuprarrenal, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, tumor teratoide/rabdoide atípico, carcinoma de células basales, cáncer de los conductos biliares, cáncer de vejiga, cáncer óseo, cáncer de cerebro/CNS, cáncer de mama, tumores bronquiales, tumores cardíacos, cáncer cervical, colangiocarcinoma, condrosarcoma, cordoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, carcinoma ductal in situ (CDIS), cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, estesieneuroblastoma, sarcoma de Ewing, tumor germinal extracraneal, tumor germinal extragonadal, cáncer de ojo, cáncer de trompa de Falopio, histiocitoma fibroso, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores carcinoides gastrointestinales, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumores de células germinales, glioma, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, hemangioblastoma, cáncer hepatocelular, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer laríngeo, leiomiomasarcoma, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, tumor carcinóide pulmonar, mesotelioma maligno, carcinoma medular, meduloblastoma, meningioma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de la vía media, cáncer de boca, mixosarcoma, síndrome mielodisplásico, neoplasias mieloproliferativas, cáncer de la cavidad nasal y seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, oligodendroglioma, cáncer oral, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, tumores de células de los islotes pancreáticos, carcinoma papilar, paraganglioma, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pinealoma, tumor pituitario, blastoma pleuropulmonar, cáncer peritoneal primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, retinoblastoma, carcinoma de células renales, cáncer de pelvis renal y uréter, rabdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, carcinoma de glándulas sebáceas, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, cáncer gástrico, carcinoma de glándulas sudoríparas, sinovialoma, cáncer testicular, cáncer de garganta, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vascular, cáncer vulvar y tumor de Wilms.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de tumores sólidos o cánceres que incluyen, sin limitación, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de hueso, cáncer de tiroides, cáncer de riñón o cáncer de piel.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de varios cánceres, incluidos, pero sin limitarse a, páncreas, vejiga y pulmón.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de cánceres líquidos o cánceres hematológicos.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de neoplasias malignas de células B, que incluyen, pero sin limitarse a: leucemias, linfomas y mieloma múltiple.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de cánceres líquidos que incluyen, pero sin limitarse a leucemias, linfomas y mielomas múltiples: leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML) y policitemia vera, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma de células grandes inmunoblásticas, linfoma precursor linfoblástico B, linfoma del manto, linfoma de zona marginal, micosis fungoide, linfoma de células grandes anaplásicas, síndrome de Sezary, linfoma precursor linfoblástico T, mieloma múltiple, mieloma múltiple manifiesto, mieloma múltiple incipiente, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma IgD, mieloma osteoesclerótico, plasmocitoma solitario óseo y plasmocitoma extramedular.

Las células preferidas para su uso en los métodos contemplados en la presente descripción incluyen células autólogas/autogénicas ("propias"), preferentemente células hematopoyéticas, con mayor preferencia células T, y con mayor preferencia células efectoras inmunitarias.

En modalidades particulares, una cantidad terapéuticamente efectiva de células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción o una composición que comprende las mismas se usan en métodos que comprenden administrar la cantidad terapéuticamente efectiva de células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción o una composición que comprende las mismas, a un paciente que las necesita, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. En ciertas modalidades, las células se usan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar un cáncer, GVHD, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria o una inmunodeficiencia. Por lo tanto, las modalidades particulares comprenden el tratamiento o prevención o mejora de al menos un síntoma de un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria o una inmunodeficiencia que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de las células editadas en el genoma contempladas en la presente descripción.

En una modalidad, una cantidad efectiva, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción puede usarse en un método para tratar un cáncer, GVHD, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, o una inmunodeficiencia en un sujeto que lo necesita administrar la cantidad efectiva, por ejemplo, cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción. La cantidad y la frecuencia de administración se determinarán por factores tales como la afección del paciente, y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque los ensayos clínicos pueden determinar las dosificaciones adecuadas.

En una modalidad ilustrativa, la cantidad efectiva de células efectoras inmunitarias modificadas proporcionadas a un sujeto es al menos  $2 \times 10^6$  células/kg, al menos  $3 \times 10^6$  células/kg, al menos  $4 \times 10^6$  células/kg, al menos  $5 \times 10^6$  células/kg, al menos  $6 \times 10^6$  células/kg, al menos  $7 \times 10^6$  células/kg, al menos  $8 \times 10^6$  células/kg, al menos  $9 \times 10^6$  células/kg o al menos  $10 \times 10^6$  células/kg, o más células/kg, que incluyen todas las dosis intermedias de células.

En otra modalidad ilustrativa, la cantidad efectiva de células efectoras inmunitarias modificadas proporcionadas a un sujeto es de alrededor de  $2 \times 10^6$  células/kg, alrededor de  $3 \times 10^6$  células/kg, alrededor de  $4 \times 10^6$  células/kg, alrededor de  $5 \times 10^6$  células/kg, alrededor de  $6 \times 10^6$  células/kg, alrededor de  $7 \times 10^6$  células/kg, alrededor de  $8 \times 10^6$  células/kg, alrededor de  $9 \times 10^6$  células/kg o alrededor de  $10 \times 10^6$  células/kg, o más células/kg, que incluyen todas las dosis intermedias de células.

En otra modalidad ilustrativa, la cantidad efectiva de células efectoras inmunitarias modificadas proporcionadas a un sujeto es de alrededor de  $2 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $10 \times 10^6$  células/kg, alrededor de  $3 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $10 \times 10^6$  células/kg, alrededor de  $4 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $10 \times 10^6$  células/kg, alrededor de  $5 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $10 \times 10^6$  células/kg,  $2 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $6 \times 10^6$  células/kg,  $2 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $7 \times 10^6$  células/kg,  $2 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $8 \times 10^6$  células/kg,  $3 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $6 \times 10^6$  células/kg,  $3 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $7 \times 10^6$  células/kg,  $3 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $8 \times 10^6$  células/kg,  $4 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $6 \times 10^6$  células/kg,  $4 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $7 \times 10^6$  células/kg,  $4 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $8 \times 10^6$  células/kg,  $5 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $6 \times 10^6$  células/kg,  $5 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $7 \times 10^6$  células/kg,  $5 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $8 \times 10^6$  células/kg o  $6 \times 10^6$  células/kg a alrededor de  $8 \times 10^6$  células/kg, incluidas todas las dosis intermedias de células.

Un experto en la técnica reconocería que pueden requerirse múltiples administraciones de las composiciones contempladas en modalidades particulares para efectuar la terapia deseada. Por ejemplo, una composición puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces durante un intervalo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1

mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

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

En una modalidad, una población de células efectoras inmunitarias modificadas puede usarse en un método para tratar a un sujeto diagnosticado con un cáncer, el método comprende eliminar las células efectoras inmunitarias del sujeto, modificar las células efectoras inmunitarias mediante la introducción de uno o más vectores que codifican un receptor de antígeno modificado genéticamente y un conversor de señal de TGF $\beta$  y producir la población de células efectoras inmunitarias modificadas, y administrar la población de células efectoras inmunitarias modificadas al mismo sujeto. En una modalidad preferida, las células efectoras inmunitarias comprenden células T.

Los métodos para administrar las composiciones celulares contempladas en modalidades particulares incluyen cualquier método que sea efectivo para resultar en la reintroducción de células efectoras inmunitarias modificadas *ex vivo* o en la reintroducción de las progenitoras modificadas de células efectoras inmunitarias que en la introducción en un sujeto se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras. Un método comprende modificar las células T de sangre periférica *ex vivo* mediante la introducción de uno o más vectores que codifican un receptor de antígeno modificado genéticamente y un conversor de señal de TGF $\beta$  y devolver las células transducidas al sujeto.

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

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Células T que expresan un conversor de señal de TGF $\beta$  IL-12R (CTBR12) y un receptor de antígeno quimérico (CAR)

Los constructos conversores de señal ilustrativos basados en TGF $\beta$  IL-12R se diseñaron como se muestra en la Figura 1.

La señalización óptima del receptor de IL-12 se inicia mediante dimerización de los dominios intracelulares de las subunidades IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 después de la ligazón de IL-12. Para convertir una señal de TGF $\beta$  para inducir la señalización del receptor de IL-12 después de la exposición a TGF $\beta$ , los dominios intracelulares del receptor 1 de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ R1) y del receptor 2 de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ R2) se reemplazaron con los dominios de señalización de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2, respectivamente. Los dominios transmembrana y de señalización de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 se clonaron en un vector lentiviral que codifica un CAR y se separaron por secuencias polipeptídicas de autoescisión 2A (CAR.CTBR12).

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1  $\mu$ g/mL) y anti-CD28 (5  $\mu$ g/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-ROR1; (ii) un CAR anti-ROR1 y un receptor de TGF $\beta$  negativo dominante (anti-ROR1.DNR); (iii) un CAR anti-ROR1 y una subunidad de TGF $\beta$ R2; o (iv) un CAR anti-ROR1 y CTBR12 (anti-ROR1.CTBR12). Después de 10 días de cultivo en medio de crecimiento que contiene IL-2, la expresión superficial celular del CAR anti-ROR1 y TGF $\beta$ R2 se determinó mediante citometría de flujo. Se usó una proteína ROR1 humana recombinante conjugada con R-ficoeritina (R-PE) para teñir específicamente las células T que expresan CAR anti-ROR1. Se usó un anticuerpo disponible comercialmente contra TGF $\beta$ R2 para detectar CTBR12. Los datos de expresión representativos se muestran en la Figura 2.

El cincuenta por ciento de las células T transducidas con el vector lentiviral que codifica el CAR anti-ROR1 y CTBR12 coexpresaron el CAR anti-ROR1 y CTBR12 (panel más a la derecha de la Figura 2). Por el contrario, ni el CAR anti-ROR1 ni el CTBR12 se detectaron en células T no transducidas, lo que indica que el anticuerpo contra TGF $\beta$ R2 no detectó TGF $\beta$ R2 endógeno.

### Ejemplo 2

Señalización inmunosupresora de TGF $\beta$  inhibida por CTBR12

La unión de TGFβ1 a un complejo tetramérico que contiene 2 unidades de TGFβR1 y 2 unidades de TGFβR2 induce la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 para propagar una señal inmunosupresora al núcleo celular. La sobreexpresión de un TGFβR2 (receptor negativo dominante de TGFβ - DNR) truncado hace que las células T sean insensibles a TGFβ, como se muestra por la pérdida de fosforilación de SMAD2/3 en respuesta al tratamiento con TGFβ. Por lo tanto, se usó la expresión de fosfo-SMAD2/3 para interrogar la activación de la vía de señalización de TGFβ.

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-ROR1; (ii) un CAR anti-ROR1 y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-ROR1.DNR); (iii) un CAR anti-ROR1 y una subunidad de TGFβR2; o (iv) un CAR anti-ROR1 y CTBR12 (anti-ROR1.CTBR12). Después de 10 días de cultivo en medio de cultivo que contenía IL-2, los cultivos se trataron con 10 ng/mL de TGFβ1 humano recombinante durante 20 minutos. La fosforilación de SMAD2/3 se evaluó con anticuerpos específicos para SMAD2/3 fosforilado. Las células T que expresan CTBR12 o DNR estaban completamente protegidas de la fosforilación de SMAD2/3 (Figura 3). Estos datos demostraron que la expresión de CTBR12 dejó las células T CAR anti-ROR1 insensibles a la señalización inmunosupresora de TGFβ.

#### Ejemplo 3

CTBR12 transduce la señalización de IL-12R después de la exposición a TGFβ1

La respuesta celular a IL-12 se inicia mediante la dimerización de receptores y la fosforilación de STAT4 y STATS. Por lo tanto, se usó la expresión de fosfo-STAT4 y fosfo-STATS para evaluar la activación de la vía de señalización del receptor de IL-12.

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-ROR1; (ii) un CAR anti-ROR1 y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-ROR1.DNR); (iii) un CAR anti-ROR1 y una subunidad de TGFβR2; o (iv) un CAR anti-ROR1 y CTBR12 (anti-ROR1.CTBR12). Después de 10 días de cultivo en medio de crecimiento que contenía IL-2, los cultivos se trataron con 50 ng/mL de IL-12 humana recombinante o con 10 ng/mL de TGFβ1 humana recombinante durante 20 minutos.

Las células T que expresan células CAR anti-ROR1 mostraron niveles aumentados de STAT4 fosforilado (Figura 4, hilera superior, comparar los 4 paneles más a la derecha con el control no transducido (UTD)). Solo las células T CAR que expresan CTBR12 mostraron niveles detectables de expresión de fosfo-STAT4 cuando se trataron con TGFβ1 humano recombinante (Figura 4, hilera inferior, comparar el panel más a la derecha con otros paneles). Por el contrario, las células T CAR que expresan solo la porción TGFβR2 del conversor de señal no fosforilaron STAT4 en respuesta al tratamiento con TGFβ (Figura 4, hilera inferior, cuarto panel de la derecha).

Las células T CAR que expresan CTBR12 también mostraron niveles detectables de fosfo-STATS cuando se trataron con IL-12 o TGFβ1, lo que confirma que la señal de TGFβ convertida induce la señalización endógena del receptor de IL-12 (Figura 5).

La expresión génica de células T CAR que expresan el anti-ROR1.CTBR12 se midió en un ensayo de expansión en serie impulsado por antígeno en presencia o ausencia de TGFβ1. Brevemente, se usaron células diana K562 marcadas con GFP que expresan el antígeno ROR1 humano para expandir en serie las células T CAR en presencia o ausencia de TGFβ1 humano recombinante. Las células T CAR se estimularon con células diana en una relación 1:1 una vez cada siete días en presencia o ausencia de TGFβ1 humano recombinante a 5 ng/mL. Se recolectaron células T y se aisló el ARNm para el análisis de expresión génica el día 21 después de la estimulación inicial. El análisis de expresión génica se realizó mediante el uso del panel de perfil inmunitario Nanostring. Se identificaron cambios significativos en la expresión génica impulsados por el tratamiento con TGFβ1 (Figura 6, panel izquierdo) en las células que expresan anti-ROR1.CTBR12, incluida la regulación positiva de los transcritos regulados por IL-12R conocidos IFNG, SELL, IL18RAP, IL18R1 e IL21R (Figura 6, panel derecho).

#### Ejemplo 4

Las células T CAR que expresan CTBR12 secretan IFNγ aumentado después de la exposición al antígeno y TGFβ1

La señalización del receptor IL-12 en células T humanas impulsa la diferenciación de TH1 y aumenta la función efectora. La señalización del receptor de IL-12 puede cooperar con las señales de TCR para aumentar la liberación de IFNγ en respuesta a la estimulación antigénica.

El conversor de señal de R2/R1 amplifica la producción de IFNγ cuando las células T se estimularon a través de un TCR o CAR en presencia de TGFβ1 humano recombinante. Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-ROR1; (ii) un CAR anti-ROR1 y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-ROR1.DNR); o (iii) un CAR anti-ROR1 y CTBR12 (anti-ROR1.CTBR12). Después de 10 días de cultivo en medio

de crecimiento que contenía IL-2, las células se sembraron en una placa de anticuerpo anti-CD3 unido a la placa (1 µg/mL) o proteína ROR1 humana recombinante (100 ng/mL) en presencia o ausencia de 5 ng/mL de TGFβ1 humana recombinante. Cuarenta y ocho horas después de la siembra, los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante Luminex para determinar el contenido de citocinas solubles.

Las células que expresan CTBR12 produjeron cantidades significativamente mayores de IFNγ que los otros tipos de células cuando se estimularon a través de TCR o CAR en presencia de TGFβ1 humano recombinante (Figura 7).

#### Ejemplo 5

Las células T CAR que expresan CTBR12 son resistentes a las señales inmunosupresoras de TGFβ1

La señalización de TGFβ disminuye la expansión de las células T en respuesta a la estimulación antigénica. Por el contrario, la señalización de IL-12 aumenta la proliferación de células T y reduce la hipofunción de las células T resultante de la exposición crónica al antígeno.

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-ROR1; (ii) un CAR anti-ROR1 y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-ROR1.DNR); o (iii) un CAR anti-ROR1 y CTBR12 (anti-ROR1.CTBR12). Después de 10 días de cultivo en medios de crecimiento que contenían IL-2, las células se sometieron a un ensayo de reestimulación en serie *in vitro*.

Brevemente, se usaron células diana K562 marcadas con GFP que expresan el antígeno ROR1 humano para expandir en serie las células T CAR en presencia o ausencia de TGFβ1 humano recombinante. Las células T CAR se estimularon con células diana en una relación 1:1 una vez cada siete días en presencia o ausencia de 5 ng/mL de TGFβ1 humano recombinante. Las células T CAR anti-ROR1 de control mostraron una expansión mínima en presencia de 5 ng/mL de TGFβ1 humano recombinante durante el transcurso del ensayo. Por el contrario, las células T CAR anti-ROR1 que coexpresan TGFβ DNR o CTBR12 estaban significativamente protegidas de la señalización inmunosupresora mediada por TGFβ1. Figura 8. Estos resultados se correlacionaron con la capacidad tanto de DNR como de CTBR12 para bloquear la fosforilación de SMAD (Figura 8).

#### Ejemplo 6

Células T que expresan un conversor de señal de TGFβ-IL-7R R2/R1 (CTBR7) y un receptor de antígeno quimérico (CAR)

Los constructos ilustrativos del conversor de señal basado en TGFβ IL-7R (CTBR7) se diseñaron como se muestra en la Figura 1.

La señalización óptima del receptor de IL-7 se inicia mediante dimerización de los dominios intracelulares del IL-7Rα y la cadena gamma común (γc; IL-2Ry) después de la ligazón de IL-7. Para convertir una señal de TGFβ para inducir la señalización del receptor de IL-7 después de la exposición a TGFβ, los dominios intracelulares del receptor 1 de TGFβ (TGFβR1) y del receptor 2 de TGFβ (TGFβR2) se reemplazaron con los dominios de señalización de IL-2Ry e IL-7Rα, respectivamente, para producir un receptor de TGFβ quimérico de señalización de IL-7 (CTBR7). Los dominios transmembrana y de señalización de IL-2Ry e IL-7Rα se clonaron en un vector lentiviral que codifica un CAR y se separaron por secuencias polipeptídicas 2A de autoescisión (CAR. CTBR7).

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-ROR1; (ii) un CAR anti-ROR1 y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-ROR1.DNR); (iii) un CAR anti-ROR1 y CTBR7 (anti-ROR1.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medio de crecimiento que contenía IL-2, la expresión en la superficie celular del CAR anti-ROR1 y TGFβR2 se determinó mediante citometría de flujo. Se usó una proteína ROR1 humana recombinante conjugada con R-ficoeritrina (R-PE) para teñir específicamente las células T que expresan CAR anti-ROR1. Se usó un anticuerpo disponible comercialmente contra TGFβR2 para detectar CTBR7. Los datos de expresión representativos se muestran en la Figura 9.

El cuarenta por ciento de las células T transducidas con el vector lentiviral que codifica el CAR anti-ROR1 y CTBR7 coexpresaron el CAR anti-ROR1 y CTBR7 (panel más a la derecha de la Figura 9). Por el contrario, ni el CAR anti-ROR1 ni el CTBR7 se detectaron en células T no transducidas, lo que indica que el anticuerpo contra TGFβR2 no detectó TGFβR2 endógeno.

#### Ejemplo 7

Señalización inmunosupresora de TGFβ inhibida por CTBR7

La unión de TGFβ1 a un complejo tetramérico que contiene 2 unidades de TGFβR1 y 2 unidades de TGFβR2 induce



la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 para propagar una señal inmunosupresora al núcleo celular. La sobreexpresión de un TGFβR2 (receptor negativo dominante de TGFβ - DNR) truncado hace que las células T sean insensibles a TGFβ, como se muestra por la pérdida de fosforilación de SMAD2/3 en respuesta al tratamiento con TGFβ. Por lo tanto, se usó la expresión de fosfo-SMAD2/3 para interrogar la activación de la vía de señalización de TGFβ.

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-ROR1; (ii) un CAR anti-ROR1 y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-ROR1.DNR); (iii) un CAR anti-ROR1 y CTBR7 (anti-ROR1.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medio de cultivo que contenía IL-2, los cultivos se trataron con 10 ng/mL de TGFβ1 humano recombinante durante 20 minutos. La fosforilación de SMAD2/3 se evaluó con anticuerpos específicos para SMAD2/3 fosforilado. Las células T que expresan CTBR7 o DNR se protegieron de la fosforilación de SMAD2/3 (Figura 10). Estos datos demostraron que la expresión de CTBR7 dejó las células CART anti-ROR1 insensibles a la señalización inmunosupresora de TGFβ.

#### Ejemplo 8

CTBR7 transduce la señalización de IL-7R después de la exposición a TGFβ1

La respuesta celular a IL-7 se inicia mediante la dimerización de receptores y la fosforilación de STATS. Por lo tanto, se usó la expresión de fosfoSTATS para evaluar la activación de la vía de señalización del receptor de IL-7 para las células T que expresan CTBR7.

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-ROR1; (ii) un CAR anti-ROR1 y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-ROR1.DNR); (iii) un CAR anti-ROR1 y CTBR7 (anti-ROR1.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medio de cultivo que contenía IL-2, los cultivos se trataron con 10 ng/mL de TGFβ1 humano recombinante durante 20 minutos. Solo las células T CAR que expresan CTBR7 mostraron niveles detectables de expresión de fosfo-STATS cuando se trataron con TGFβ1 humano recombinante (Figura 11, comparar el panel más a la derecha con otros paneles).

Para interrogar adicionalmente la señalización de IL-7R convertida, se determinó la capacidad de las células que expresan CTBR7 para regular positivamente la expresión de la proteína Bcl-2 en respuesta a la exposición continua a TGFβ1. Las células T CAR de control o las células T CAR que expresan ya sea DNR (anti-ROR1.DNR) o CTBR7 (anti-ROR1.CTBR7) se sometieron a un ensayo de expansión en serie impulsado por antígeno en ausencia del soporte de citocinas exógenas y la presencia o ausencia de TGFβ1. Brevemente, se usaron células diana K562 marcadas con GFP que expresan el antígeno ROR1 humano para expandir en serie las células T CAR en presencia o ausencia de TGFβ1 humano recombinante. Las células T CAR se estimularon con células diana en una relación 1:1 una vez cada siete días en presencia o ausencia de TGFβ1 humano recombinante a 5 ng/mL. Seis días después de la segunda estimulación, se interrogaron las células T CAR anti-ROR1, CAR anti-ROR1.DNR o CAR anti-ROR1.CTBR7 para determinar la expresión de la proteína Bcl-2 mediante citometría de flujo. Solo las células T CAR que expresan CTBR7 demostraron niveles aumentados de expresión de la proteína Bcl-2 cuando se expandieron en presencia de TGFβ1 (Figura 12).

#### Ejemplo 9

Las células T CAR que coexpresan CTBR7 demuestran actividad efectora sostenida en ausencia DE IL-2 exógena y en presencia de TGFβ1

La señalización de TGFβ disminuye la expansión de las células T en respuesta a la estimulación antigénica. Por el contrario, la señalización de IL-7 puede inducir la proliferación y supervivencia de células T, una actividad que es particularmente evidente para las poblaciones de células T de memoria. Para evaluar si la señalización de CTBR7 podría aumentar la actividad efectora de las células T CAR en presencia de TGFβ1, se comparó la expansión de CAR.CTBR7 y la actividad antitumoral contra las células T CAR de control y las células T CAR.DNR en un ensayo de reestimulación en serie donde no se proporcionó soporte exógeno de citocinas IL-2.

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-ROR1; (ii) un CAR anti-ROR1 y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-ROR1.DNR); o (iii) un CAR anti-ROR1 y CTBR7 (anti-ROR1.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medios de crecimiento que contenían IL-2, las células se sometieron a un ensayo de reestimulación en serie *in vitro* en ausencia de soporte exógeno de citocinas IL-2.

Brevemente, se usaron células diana K562 marcadas con GFP que expresan el antígeno ROR1 humano para expandir en serie las células T CAR en presencia o ausencia de TGFβ1 humano recombinante. Las células T CAR se estimularon con células diana en una relación 1:1 una vez cada siete días en presencia o ausencia de TGFβ1 humano recombinante a 5 ng/mL. No se usó IL-2 exógena como soporte en este ensayo. Las células T CAR anti-ROR1 de control mostraron una expansión mínima en presencia de 5 ng/mL de TGFβ1 humano recombinante durante el

transcurso del ensayo. Las células T CAR que coexpresan DNR también demostraron una expansión reducida cuando se expandieron en presencia de TGFβ1. Por el contrario, las células T CAR anti-ROR1 que coexpresan CTBR7 demostraron una expansión mejorada en comparación con las mismas células expandidas en ausencia de TGFβ1 (Figura 13). Estos datos demostraron que la señalización activa de CTBR7 aumentó la expansión de las células T en comparación con el CAR solo.

Las células T CAR que coexpresan CTBR7 despejan las células tumorales del cultivo en el ensayo de reestimulación en serie descrito anteriormente sin soporte de IL-2. Después de la segunda ronda de estimulación, solo las células T CAR que coexpresen CTBR7 y se traten con TGFβ1 despejan completamente la población tumoral (según lo controlado por la presencia de células tumorales positivas para GFP que permanecen en cultivo) (Figura 13). Estos datos demostraron que la señalización de CTBR7 fue suficiente para respaldar la función efectora en condiciones en las que la señalización de CAR sola no fue suficiente.

#### Ejemplo 10

Células T que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un CTBR12 o CTBR7

Los constructos de conversor de señal ilustrativos de TGFβ IL-12R o TGFβ IL-7R se diseñaron como se muestra en la Figura 1.

Los dominios transmembrana y de señalización de IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 se clonaron en un vector lentiviral que codifica un CAR anti-EGFR y se separaron por secuencias polipeptídicas de autoescisión 2A (anti-EGFR.CTBR12).

Los dominios transmembrana y de señalización de IL-2Ry e IL-7Rα se clonaron en un vector lentiviral que codifica CAR anti-EGFR y se separaron por secuencias polipeptídicas de autoescisión 2A (anti-EGFR. CTBR7).

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-EGFR; (ii) un CAR anti-EGFR y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-EGFR.DNR); (iii) un CAR anti-EGFR y CTBR12 (anti-EFGR.CTBR12); y (iv) un CAR anti-EGFR y CTBR7 (anti-EFGR.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medio de crecimiento que contenía IL-2, se determinó la expresión en la superficie celular del CAR anti-EGFR y TGFβR2 mediante citometría de flujo. Los datos representativos de expresión se muestran en la Figura 15 (panel superior).

#### Ejemplo 11

Señal inmunosupresora de TGFβ inhibida por células T que expresan un car anti-EGFR y CTBR12 o un CAR anti-EGFR y CTBR7

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-EGFR; (ii) un CAR anti-EGFR y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-EGFR.DNR); (iii) un CAR anti-EGFR y CTBR12 (anti-EFGR.CTBR12); y (iv) un CAR anti-EGFR y CTBR7 (anti-EFGR.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medio de cultivo que contenía IL-2, los cultivos se trataron con 10 ng/mL de TGFβ1 humano recombinante durante 20 minutos. La fosforilación de SMAD2/3 se evaluó con anticuerpos específicos para SMAD2/3 fosforilado. Las células T que expresan DNR, CTBR12 o CTBR7 estaban completamente protegidas de la fosforilación de SMAD2/3 (Figura 15, panel inferior). Estos datos demostraron que la expresión de CTBR12 o CTBR7 hizo que las células T CAR anti-EGFR fueran insensibles a la señalización inmunosupresora de TGFβ.

#### Ejemplo 12

CTBR transduce la señalización de IL-R después de la exposición a TGFβ1

La respuesta celular a IL-12 se inicia mediante la dimerización de receptores y la fosforilación de STAT4 y STATS. La expresión de fosfo-STAT4 se usó para evaluar la activación de la vía de señalización del receptor de IL-12 para las células T que expresan anti-EGFR.CTBR12.

La respuesta celular a IL-7 se inicia mediante la dimerización de receptores y la fosforilación de STATS. Por lo tanto, se usó la expresión de fosfoSTATS para evaluar la activación de la vía de señalización del receptor de IL-7 para las células T que expresan anti-EGFR.CTBR7.

Las células T humanas primarias de las PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-EGFR; (ii) un CAR anti-EGFR y CTBR12 (anti-EFGR.CTBR12); y (iii) un CAR anti-EGFR y CTBR7 (anti-EFGR.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medios de crecimiento que contenían IL-2, los cultivos de células T se trataron con IL-12 humana recombinante o TGFβ1 humana recombinante durante 20 minutos (Figura 16) o con IL-7 humana recombinante o TGFβ1 humana recombinante durante 20 minutos (Figura 17).

Las células T que expresan CAR anti-EGFR o anti-EFGR.CTBR12 muestra niveles aumentados de STAT4 fosforilado en presencia de IL-12 (Figura 16, paneles izquierdos), pero solo las células T que expresan anti-EFGR.CTBR12 muestran niveles aumentados de STAT4 fosforilado en presencia de TGFβ1 (Figura 16, panel derecho inferior).

- 5 Las células T que expresan CAR anti-EGFR o anti-EFGR. CTBR7 muestra niveles aumentados de STATS fosforilados en presencia de IL-7 (Figura 17, paneles izquierdos), pero solo las células T que expresan anti-EFGR.CTBR7 muestra niveles aumentados de STAT4 fosforilado en presencia de TGFβ1 (Figura 17, panel inferior derecho).

#### Ejemplo 13

- 10 Las células T CAR que expresan CTBR12 secretan IFNγ aumentado después de la exposición al antígeno y TGFβ1

Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan: (i) un CAR anti-EGFR; (ii) un CAR anti-EGFR y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-EGFR.DNR); o (iii) un CAR anti-EGFR y CTBR12 (anti-EF-GR.CTBR12). Después de 10 días de cultivo en medio de crecimiento que contenía IL-2, se cultivaron células T que expresan CAR y CTBR con células Jurkat (EGFR(-)), células A549 (EGFR(+)) o células HT1080 (EGFR(+)) durante 48 horas ya sea en presencia o ausencia de 5 ng/mL de TGFβ1 humano recombinante. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante Luminex para determinar el contenido de citocinas solubles.

20 Las células que expresan CTBR12 produjeron cantidades significativamente mayores de IFNγ cuando se cultivaron con líneas celulares EGFR(+) en comparación con las líneas celulares EGFR(-) en presencia de TGFβ1 humano recombinante (Figura 18).

#### 25 Ejemplo 14

Las células T CAR anti-EGFR que coexpresan CTBR demuestran actividad efectora sostenida en ausencia de IL-2 exógena y en presencia de TGFβ1

- 30 Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un CAR anti-EGFR; (ii) un CAR anti-EGFR y un receptor de TGFβ negativo dominante (anti-EGFR.DNR); (iii) un CAR anti-EGFR y CTBR12 (anti-EF-GR.CTBR12); y (iv) un CAR anti-EGFR y CTBR7 (anti-EFGR.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medios de crecimiento que contenían IL-2, las células se sometieron a un ensayo de reestimulación en serie *in vitro* en ausencia de soporte exógeno de citocinas IL-2.

35 Brevemente, se usaron células diana marcadas con GFP que expresan el antígeno de EGFR humano para expandir en serie las células T CAR en presencia o ausencia de TGFβ1 humano recombinante. Las células T CAR se estimularon con células diana en una relación 1:1 una vez cada siete días en presencia o ausencia de TGFβ1 humano recombinante a 5 ng/mL. No se usó IL-2 exógena como soporte en este ensayo. Las células T CAR anti-EGFR de control mostraron una expansión mínima en presencia de 5 ng/ml de TGFβ1 humano recombinante a través de la primera estimulación y no se cultivaron más. Las células T CAR que coexpresan DNR también demostraron una expansión reducida cuando se expandieron en presencia de TGFβ1. Por el contrario, las células T CAR anti-EGFR que coexpresan CTBR12 o CTBR7 demostraron una expansión mejorada en comparación con las mismas células expandidas en ausencia de TGFβ1 (Figura 19). Estos datos demostraron que la señalización de CTBR12 o CTBR7 activa aumentó la expansión de células T en comparación con el CAR solo.

#### Ejemplo 15

- 50 Las células T TCR NY-ESO1 que coexpresan CTBR demuestra actividad efectora sostenida en ausencia de IL-2 exógena y en presencia de TGFβ1

Los constructos de conversor de señal de TGFβ IL-12R y TGFβ IL-R basados en TCR ilustrativos se diseñaron como se muestra en la Figura 20.

- 55 Los dominios transmembrana y de señalización de IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 se clonaron en un vector lentiviral que codifica un TCR anti-NY-ESO1 y se separaron por secuencias polipeptídicas de autoescisión 2A (NY-ESO1.CTBR12).

Los dominios transmembrana y de señalización de IL-2Ry e IL-7Rα se clonaron en un vector lentiviral que codifica NY-ESO1 TCR y se separaron por secuencias polipeptídicas de autoescisión 2A (NY-ESO1.CTBR7).

- 60 Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un NY-ESO1 TCR; (ii) un NY-ESO1 TCR y un receptor de TGFβ negativo dominante (NY-ESO1.DNR); (iii) un NY-ESO1 TCR y CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12); y (iv) un NY-ESO1 TCR y CTBR7 (NY-ESO1.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medio de crecimiento que contenía IL-2, la expresión en la superficie celular de NY-ESO1 TCRR y TGFβR2 se determinó

mediante citometría de flujo. Se expresaron todos los constructos.

#### Ejemplo 16

- 5 Señalización inmunosupresora de TGFβ inhibida por células T que expresan NY-ESO TCR y CTBR12 o NY-ESO TCR y CTBR7

10 Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un NY-ESO1 TCR; (ii) un NY-ESO1 TCR y un receptor de TGFβ negativo dominante (NY-ESO1.DNR); (iii) un NY-ESO1 TCR y CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12); y (iv) un NY-ESO1 TCR y CTBR7 (NY-ESO1.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medio de cultivo que contenía IL-2, los cultivos se trataron con 10 ng/mL de TGFβ1 humano recombinante durante 20 minutos. La fosforilación de SMAD2/3 se evaluó con anticuerpos específicos para SMAD2/3 fosforilado. Las células T que expresan DNR, CTBR12 o CTBR7 se protegieron completamente de la fosforilación de SMAD2/3 (Figura 21). Estos datos demostraron que la expresión de CTBR12 o CTBR7 dejó a las células NY-ESO1 TCR insensibles a la señalización inmunosupresora de TGFβ.

#### Ejemplo 17

- 20 CTBR transduce la señalización de IL-R después de la exposición a TGFβ1

La respuesta celular a IL-12 se inicia mediante la dimerización de receptores y la fosforilación de STAT4 y STATS. La expresión de fosfo-STAT4 se usó para evaluar la activación de la vía de señalización del receptor de IL-12 para las células T que expresan NY-ESO1.CTBR12.

- 25 La respuesta celular a IL-7 se inicia mediante la dimerización de receptores y la fosforilación de STATS. Por lo tanto, se usó la expresión de fosfoSTATS para evaluar la activación de la vía de señalización del receptor de IL-7 para las células T que expresan NY-ESO1.CTBR7.

- 30 Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan (i) un NY-ESO1 TCR y CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12); y (ii) un NY-ESO1 TCR y CTBR7 (NY-ESO1.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medios de crecimiento que contenían IL-2, los cultivos de células T se trataron con IL-7 humana recombinante o TGFβ1 humana recombinante durante 20 minutos (Figura 22, panel superior) o con IL-12 humana recombinante o TGFβ1 humana recombinante durante 20 minutos (Figura 22, panel inferior).

#### Ejemplo 18

- 40 Las células T CAR que expresan CTBR12 secretan IFNγ aumentado después de la exposición al antígeno y TGFβ1

45 Las células T humanas primarias de PBMC de donantes sanos se activaron con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (5 µg/mL) solubles y se transdujeron con vehículo o vectores lentivirales que expresan: (i) un NY-ESO1 TCR; (ii) un NY-ESO1 TCR y un receptor de TGFβ negativo dominante (NY-ESO1.DNR); (iii) un NY-ESO1 TCR y CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12); y (iv) un NY-ESO1 TCR y CTBR7 (NY-ESO1.CTBR7). Después de 10 días de cultivo en medio de crecimiento que contenía IL-2, se cultivaron células T que expresan CAR y CTBR con células SaOs2 (A2, NY-ESO1(+)) o células A549.A2.NY-ESO1 (A2, NY-ESO1(+)) a una relación 5:1 de células T con respecto a células diana durante 48 horas ya sea en presencia o ausencia de 5 ng/mL de TGFβ1 humano recombinante. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante Luminex para determinar el contenido de citocinas solubles.

- 50 Las células que expresan CTBR12 produjeron cantidades significativamente mayores de IFNγ cuando se cultivaron con las líneas celulares A2 y NY-ESO1 (+) en presencia de TGFβ1 humano recombinante en comparación con las líneas celulares A2 y NY-ESO1 (+) (Figura 23). Las células que expresan CTBR demuestran resistencia a la señalización inmunosupresora de TGFβ.

55

## REIVINDICACIONES

1. Un vector lentiviral que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende:

I)

(a) un polipéptido TGF $\beta$ R2 que comprende:

(i) un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1;

(ii) un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 2; y

(iii) un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 2;

(b) un péptido 2A de autoescisión viral; y

(c) un polipéptido TGF $\beta$ R1 que comprende:

(i) un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1;

(ii) un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 1; y

(iii) un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 1; o

II)

(a) un polipéptido TGF $\beta$ R2 que comprende:

(i) un dominio extracelular de TGF $\beta$ R2 de unión a TGF $\beta$ 1;

(ii) un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 1; y

(iii) un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 1;

(b) un péptido 2A de autoescisión viral; y

(c) un polipéptido TGF $\beta$ R1 que comprende:

(i) un dominio extracelular de TGF $\beta$ R1 de unión a TGF $\beta$ 1;

(ii) un dominio transmembrana de IL-12R $\beta$ 2; y

(iii) un dominio de señalización intracelular de IL-12R $\beta$ 2.

2. El vector lentiviral de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un receptor de antígeno modificado genéticamente y un segundo polipéptido 2A de autoescisión viral.

3. El vector lentiviral de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el segundo polipéptido 2A de autoescisión viral se selecciona del grupo que consiste en: un péptido del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) (F2A), un péptido del virus de la rinitis equina A (ERAV) (E2A), un péptido del virus de Thosa asigna (TaV) (T2A), un péptido del tesovirus-1 porcino (PTV-1) (P2A), un péptido 2A de Teilovirus y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis.

4. El vector lentiviral de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el receptor de antígeno modificado genéticamente se selecciona del grupo que consiste en: un receptor de células T (TCR) modificado genéticamente, un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor DARIC o componentes del mismo, y un receptor de citocinas quimérico.

5. El vector lentiviral de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el receptor de antígeno modificado genéticamente reconoce un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: receptor de folato alfa, 5T4,  $\alpha$ v $\beta$ 6 integrina, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, fetal AchR, FR $\alpha$ , GD2, GD3, Glipicano-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEMs, VEGFR2 y WT-1.

6. Una célula que comprende el vector lentiviral de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. La célula de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la célula es:

(a) una célula hematopoyética;

(b) una célula T;

(c) una célula CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup>;

(d) una célula efectora inmunitaria;

(e) unos linfocitos T citotóxicos (CTL), unos linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) o una células T auxiliares; o

(f) una célula asesina natural (NK) o una célula T asesina natural (NKT).

8. Una composición que comprende el vector lentiviral de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la célula de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7.
  9. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y el vector lentiviral de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o la célula de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7.
- 5

FIGURA 1

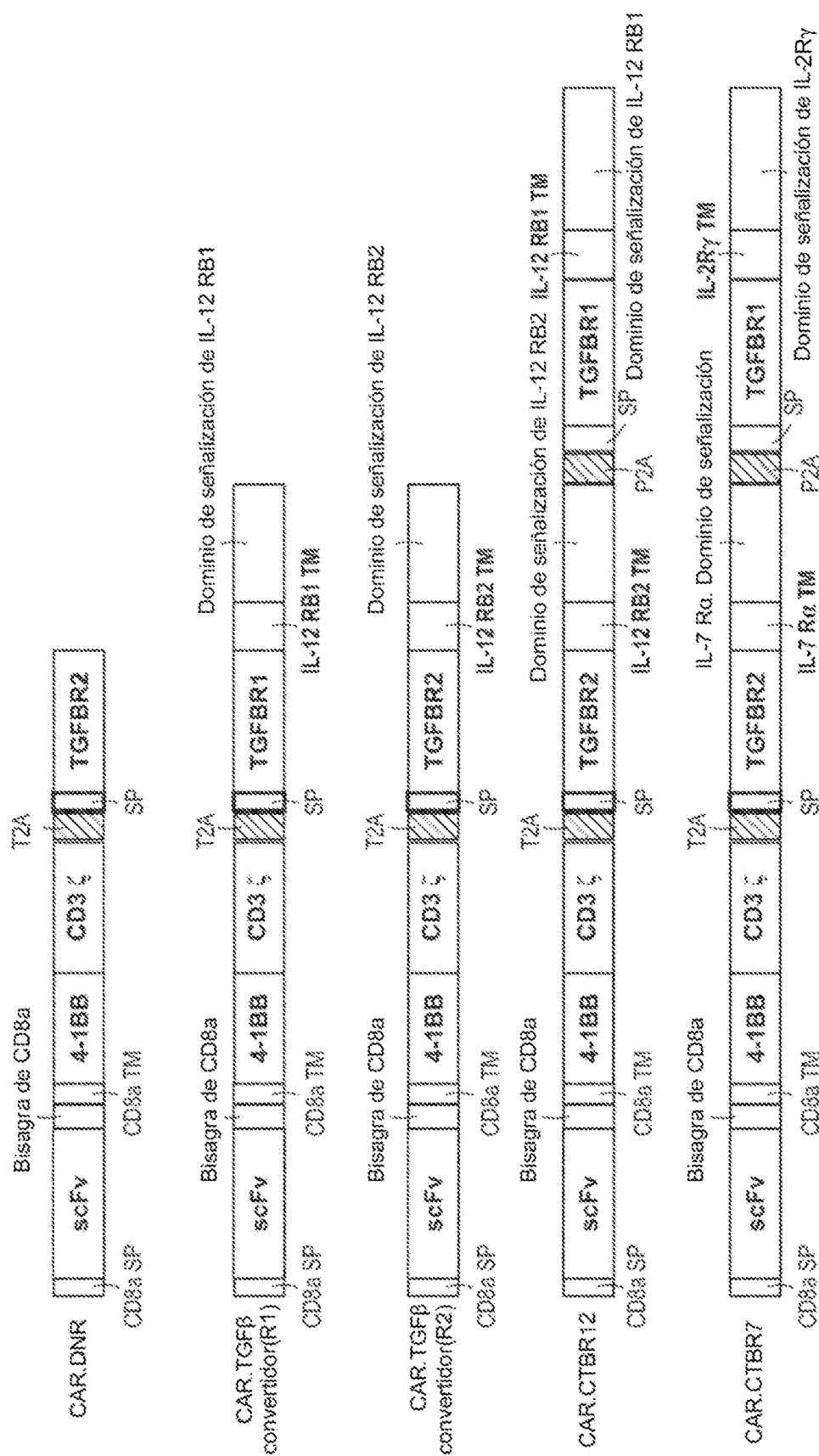
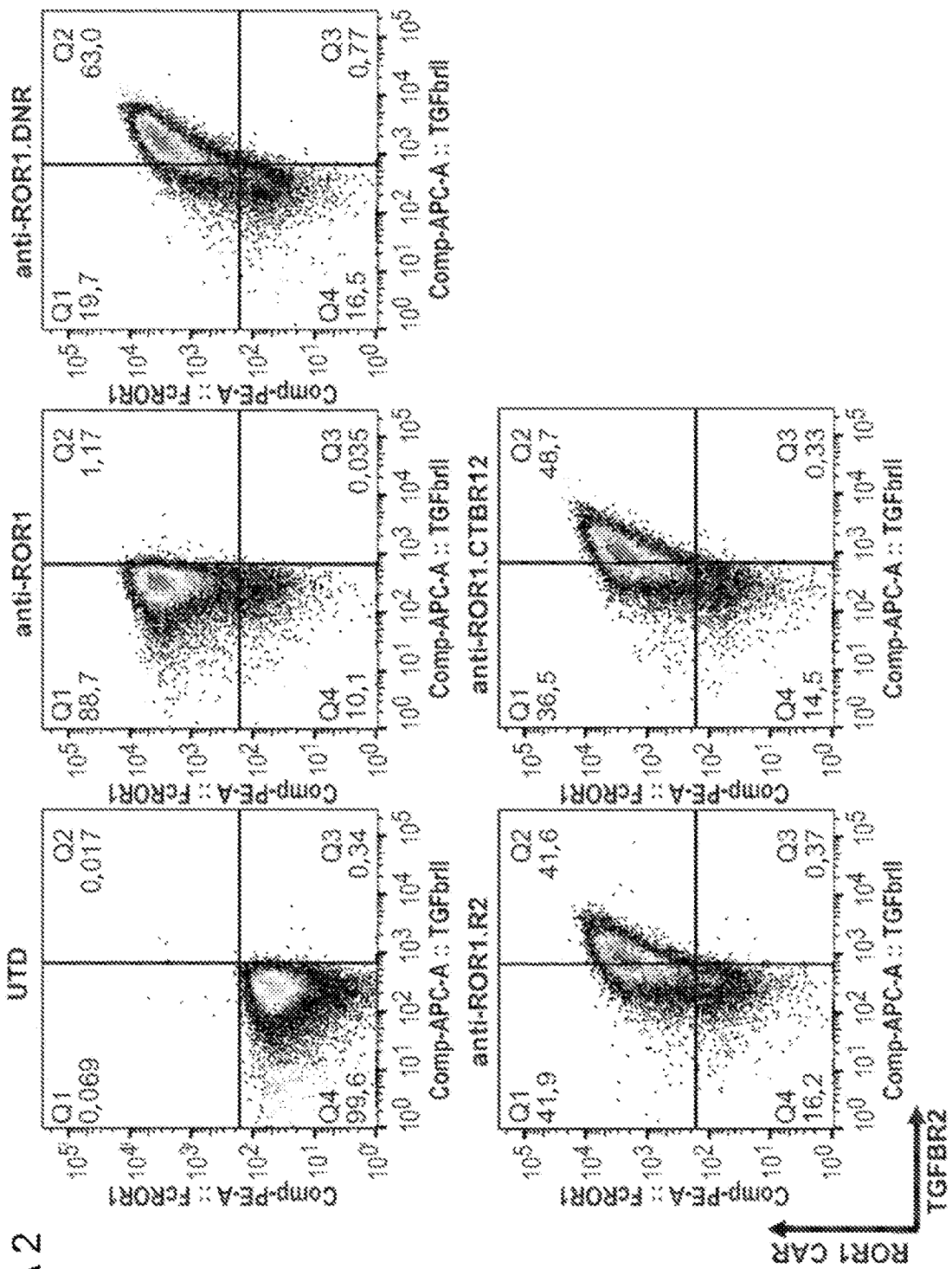


FIGURA 2





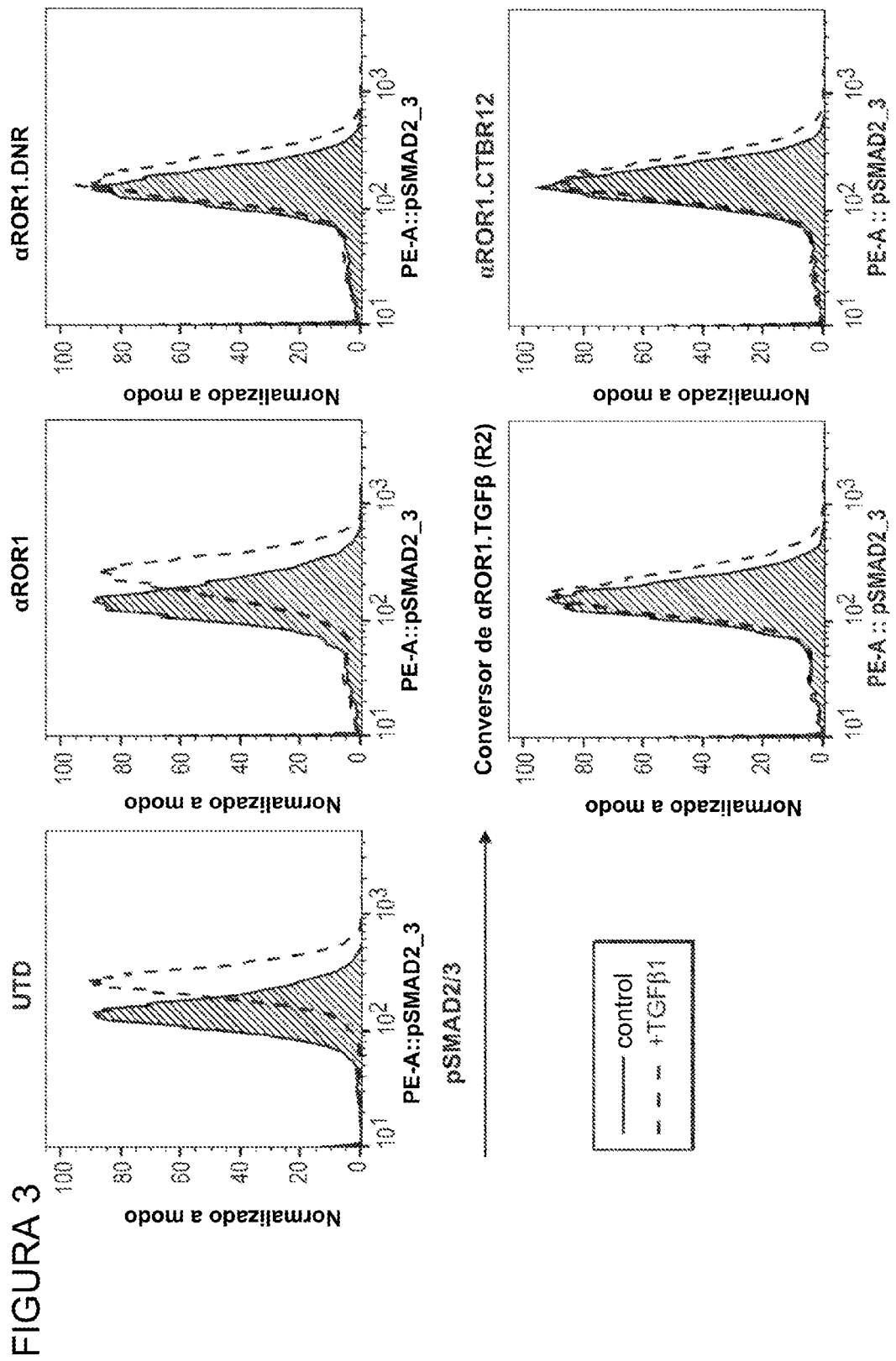


FIGURA 4

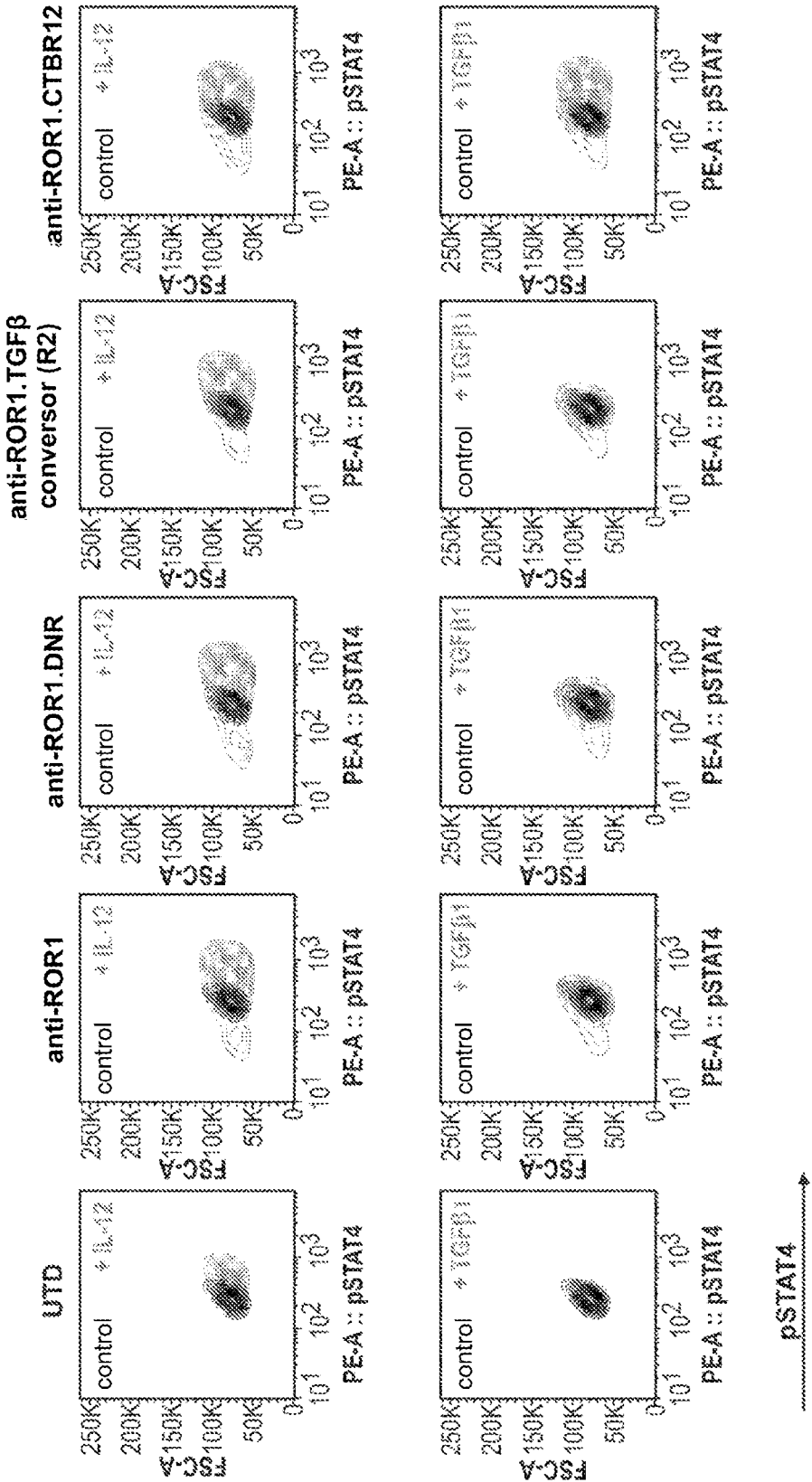


FIGURA 5

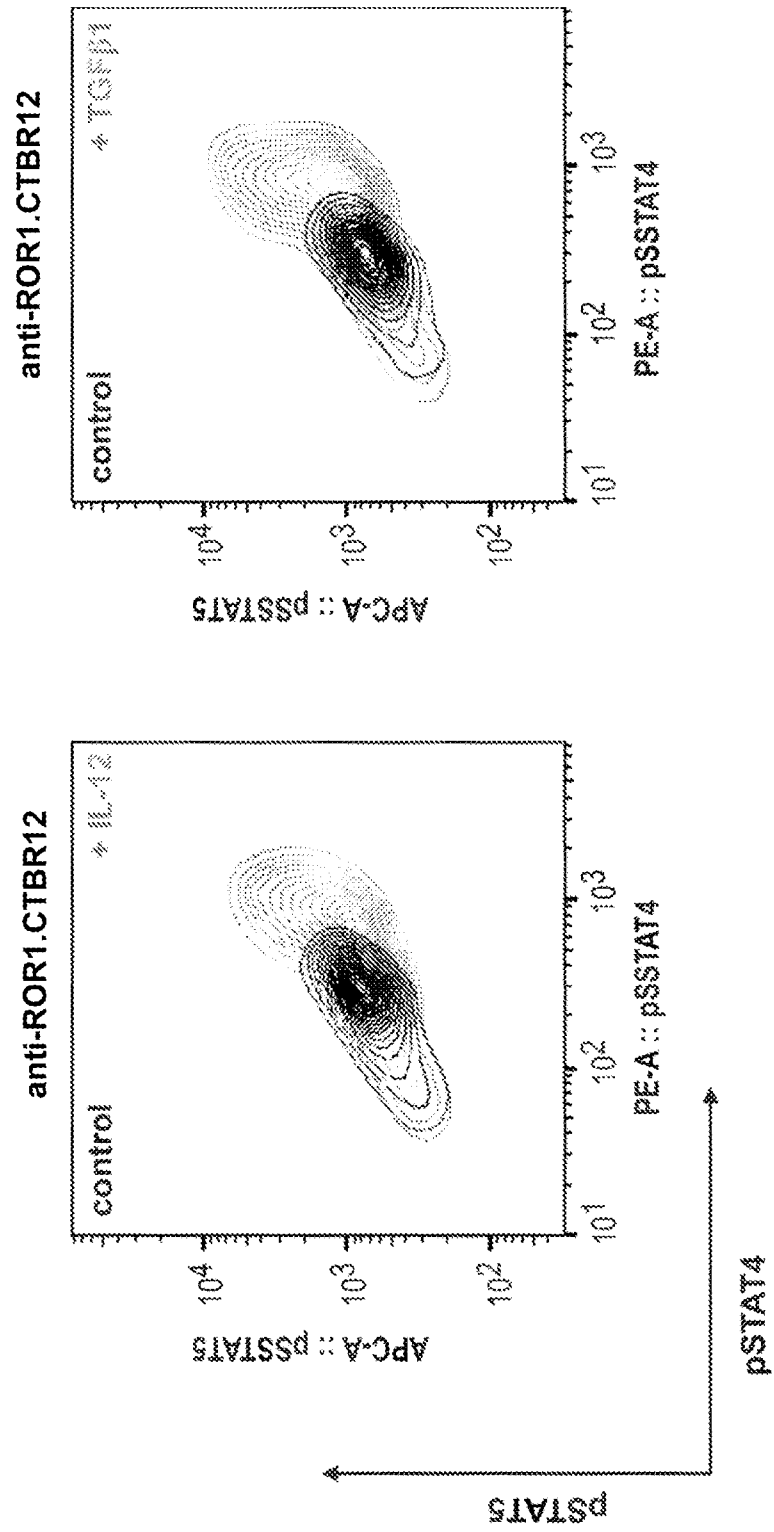


FIGURA 6

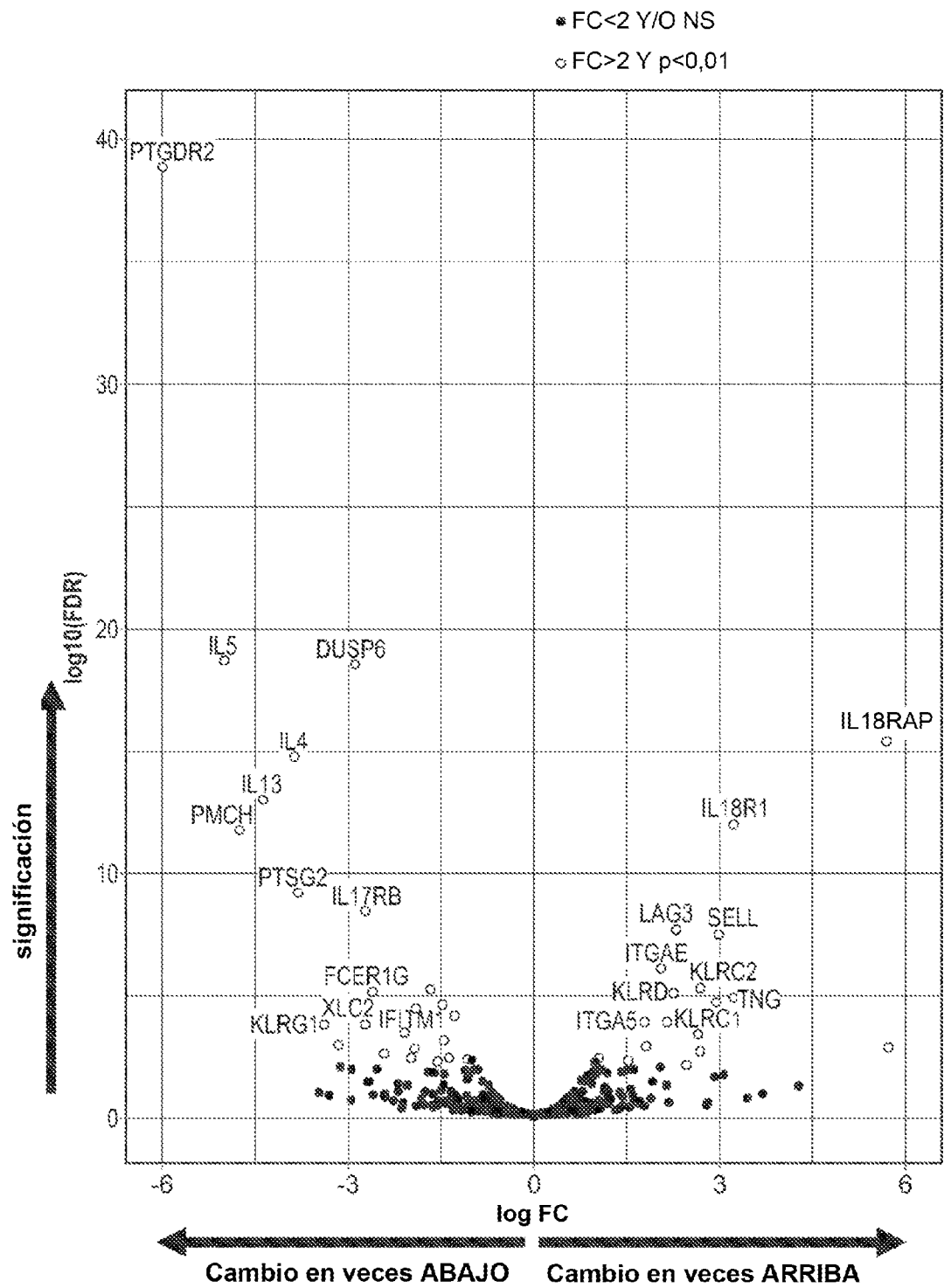


FIGURA 6 (continuación)

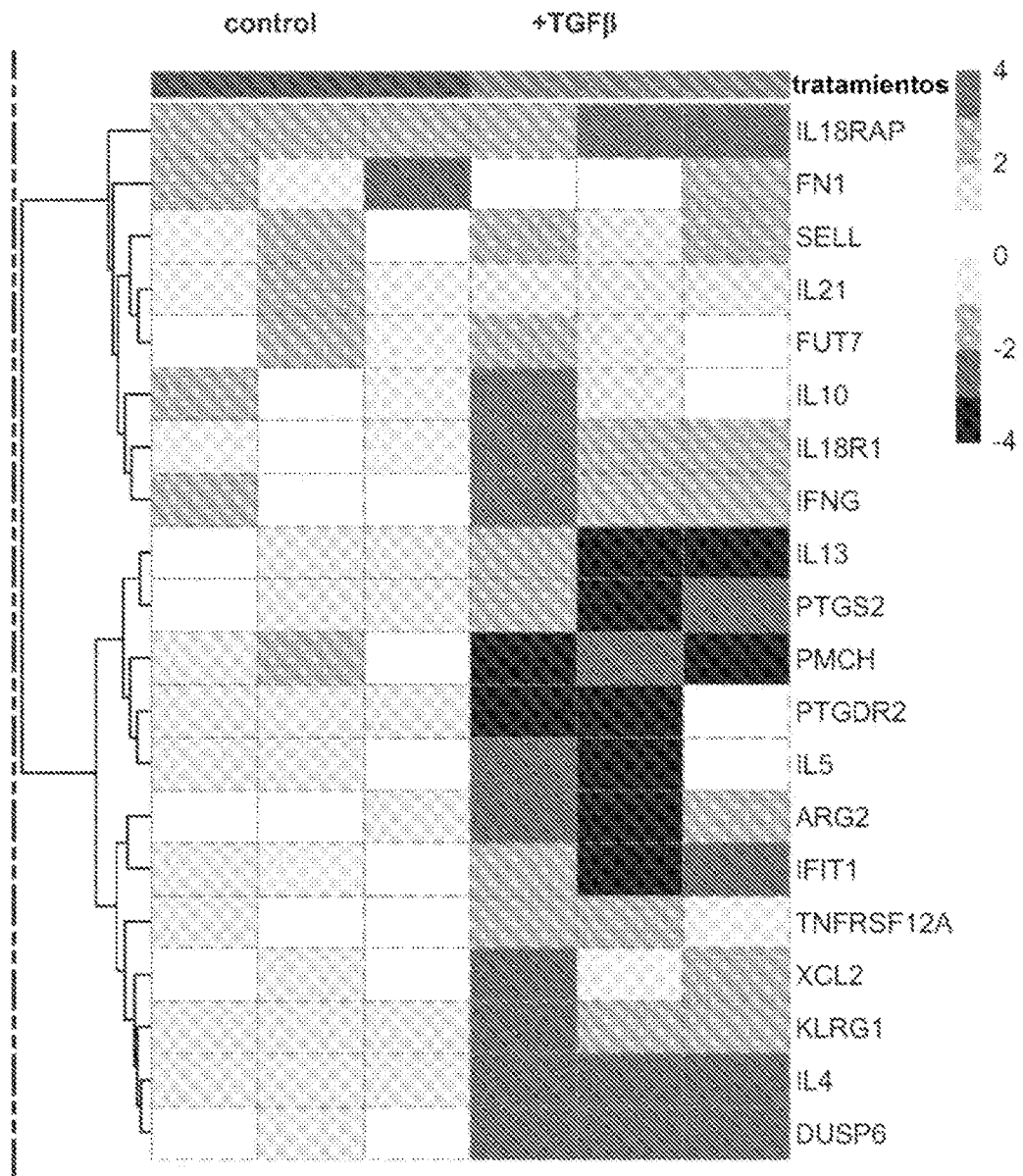
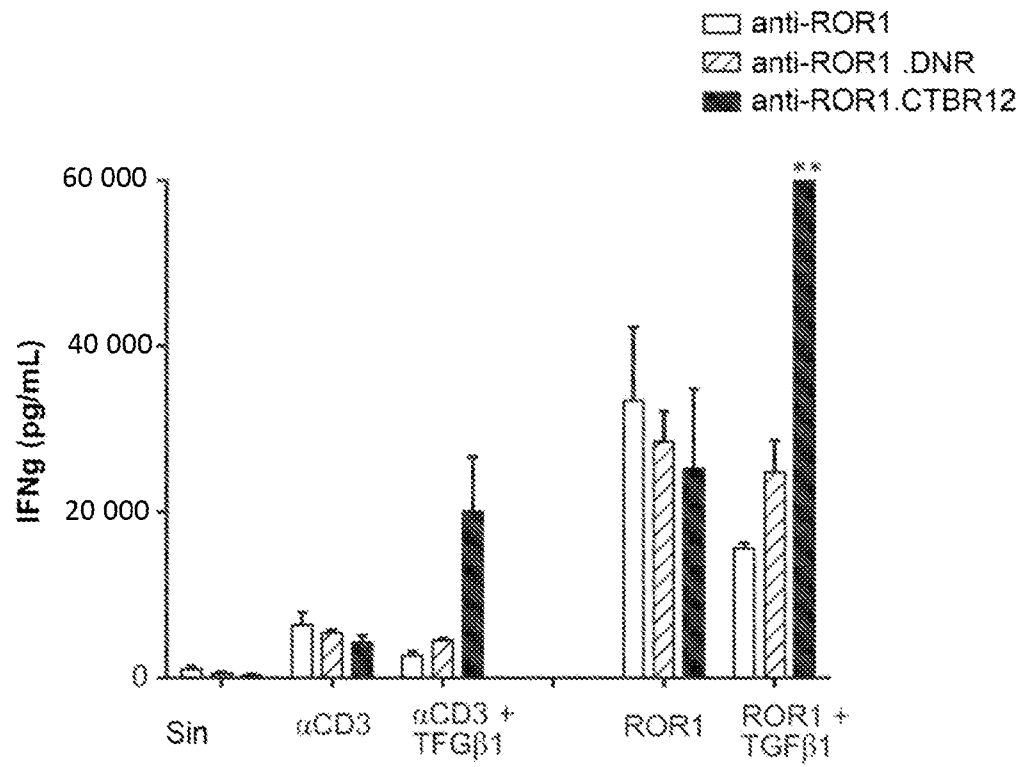


FIGURA 7



\*datos compilados de 3 donantes

\*\*valor fuera de escala -fuera del intervalo lineal del ensayo

FIGURA 8

- anti-ROR1
- ▲- anti-ROR1 + TGFβ1
- anti-ROR1.DNR
- anti-ROR1.DNR+ TGFβ1
- anti-ROR1.CTBR12
- ⊙- anti-ROR1.CTBR12 + TGFβ1

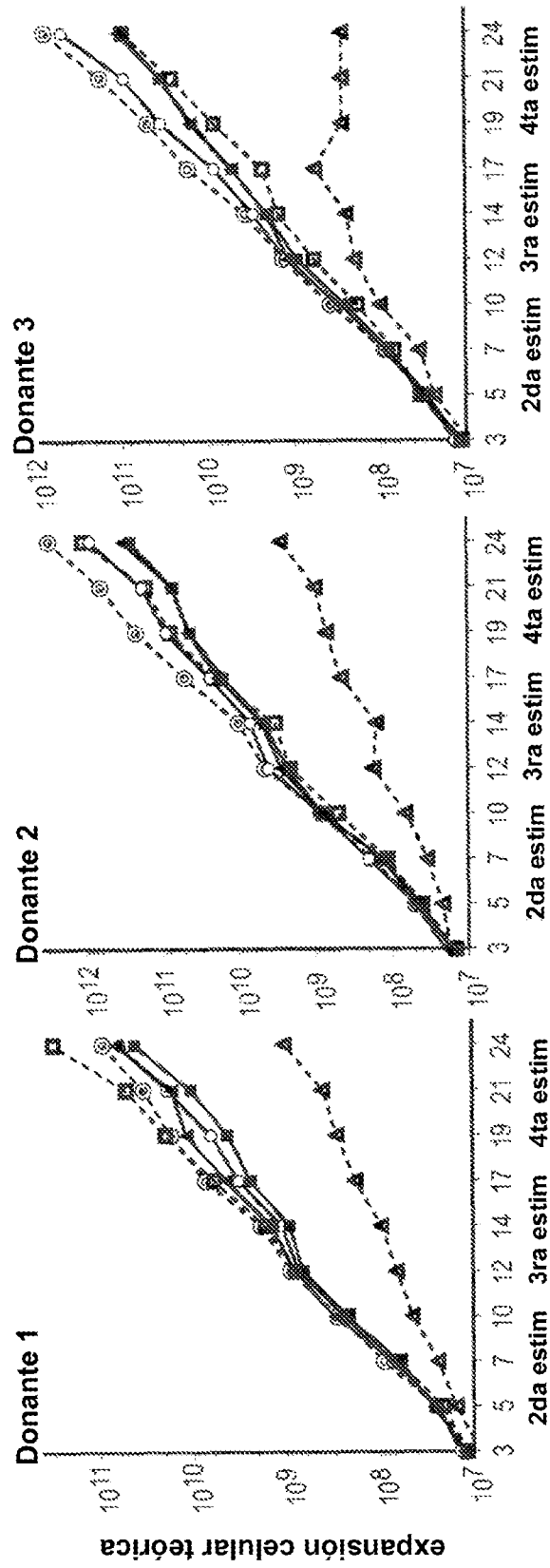


FIGURA 9

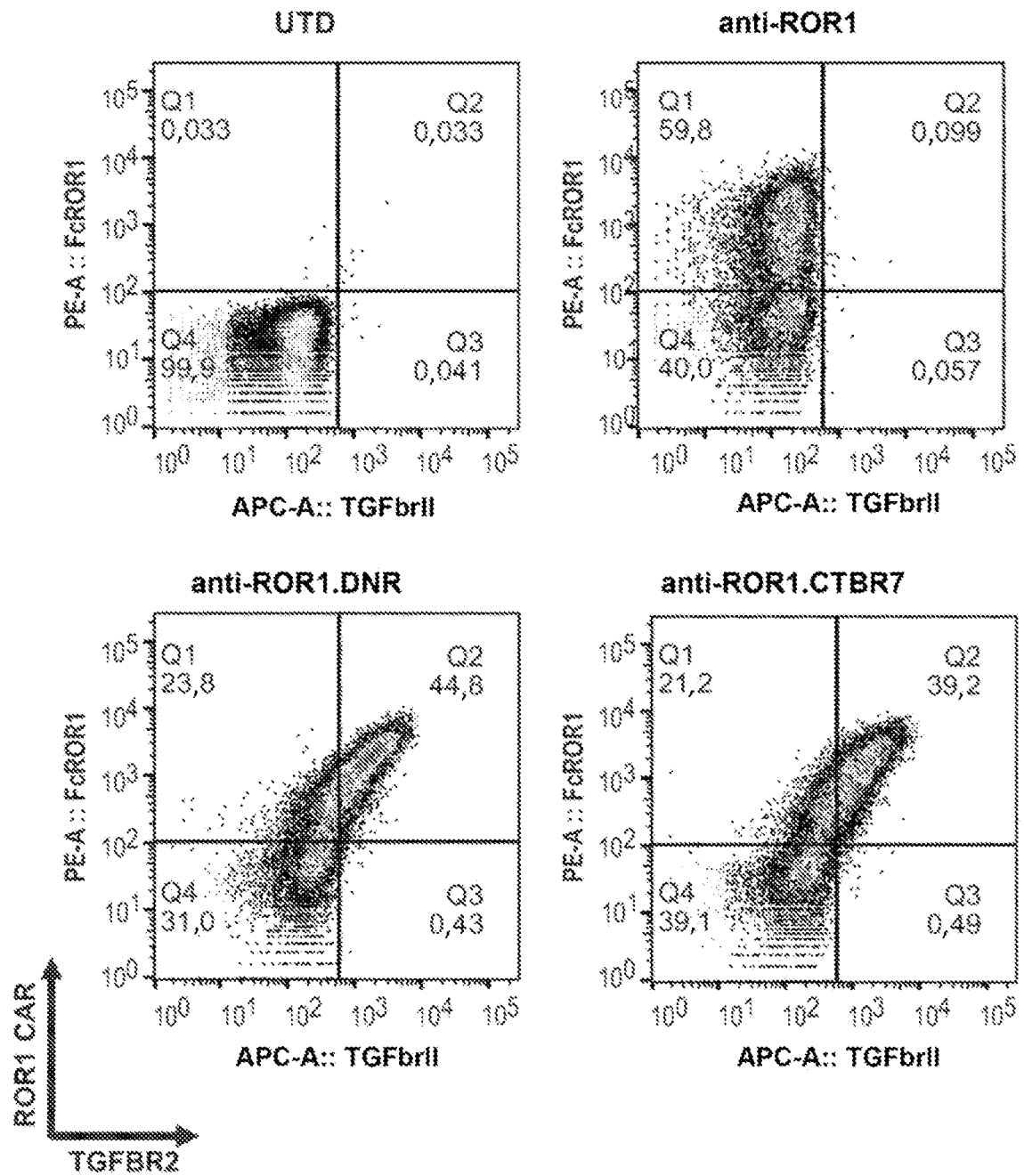




FIGURA 10

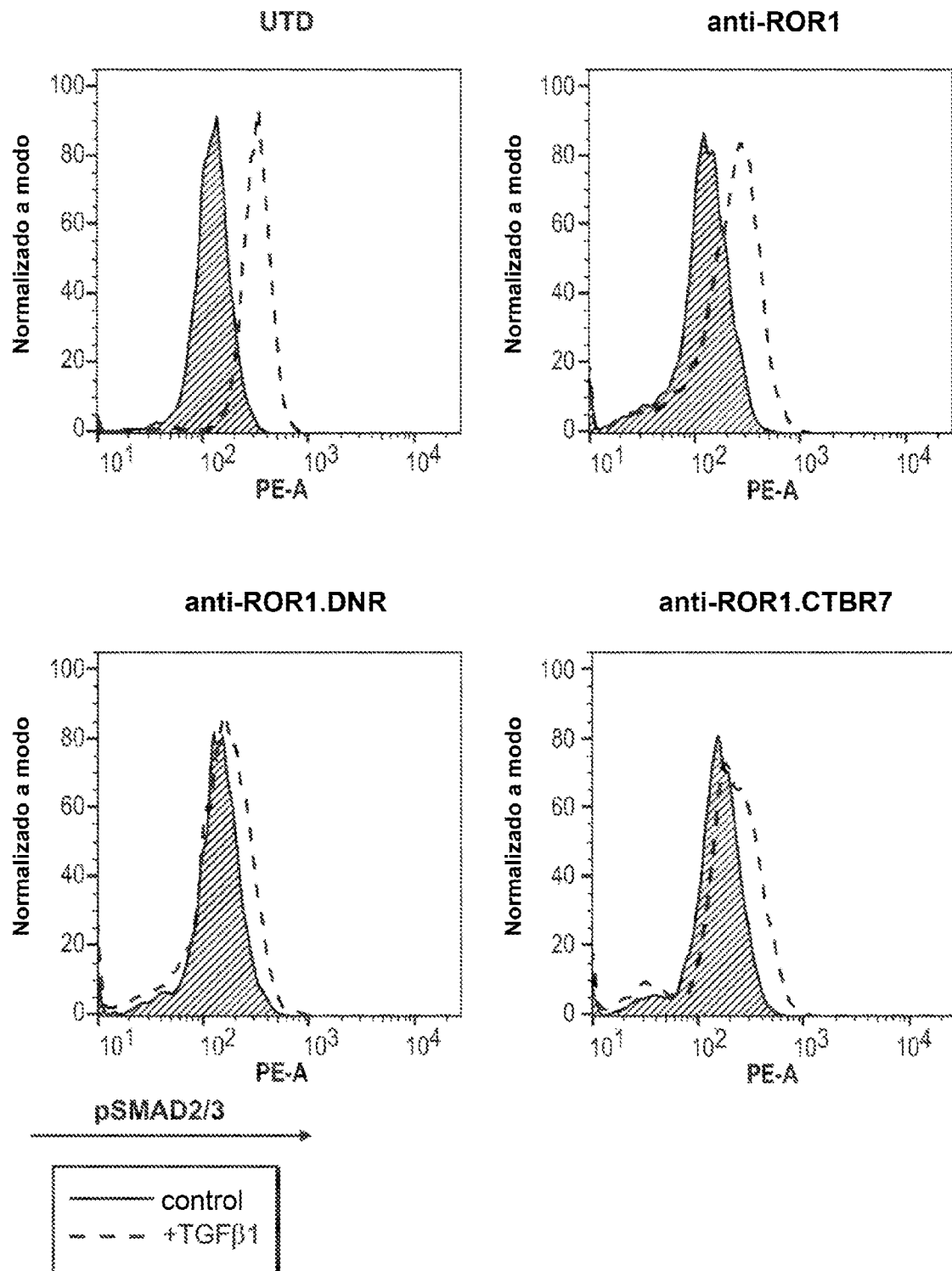
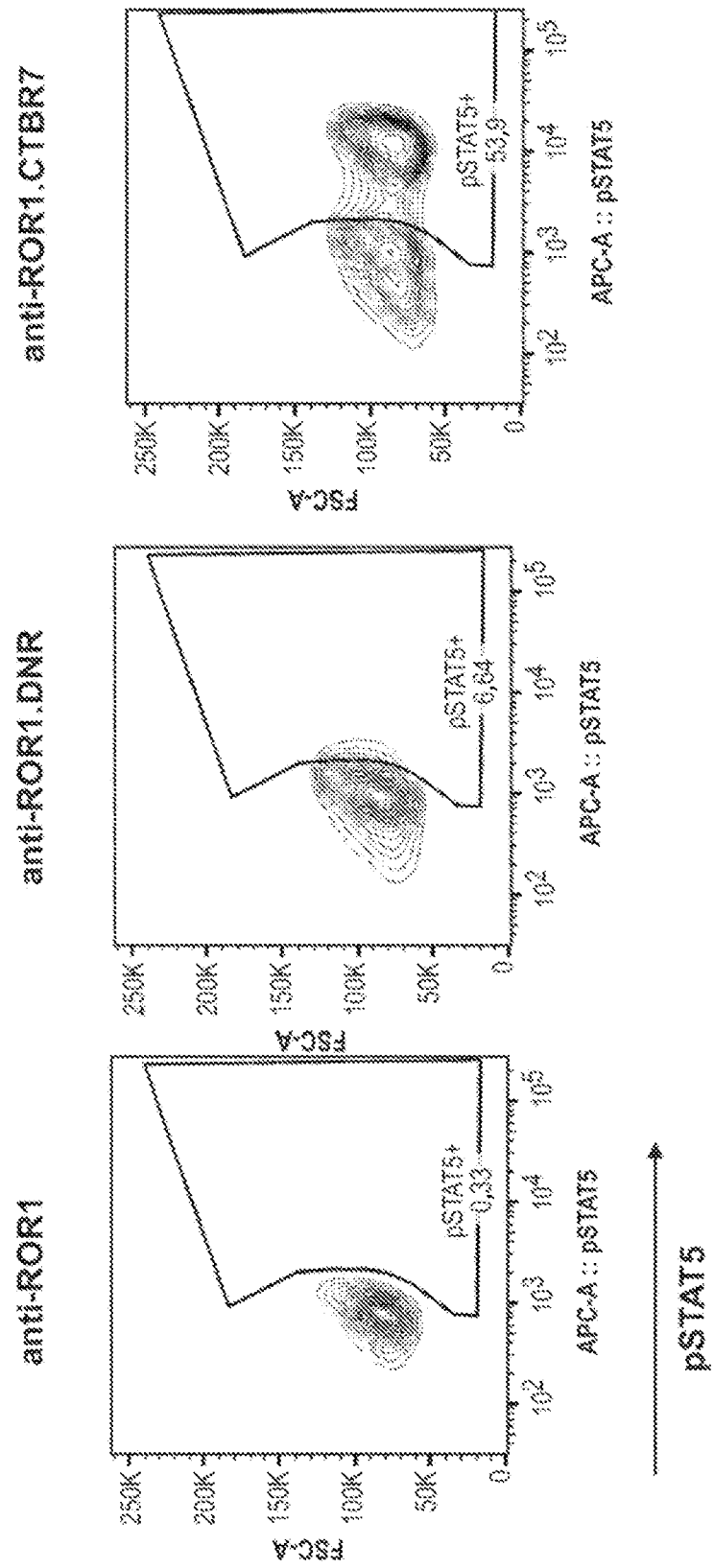


FIGURA 11



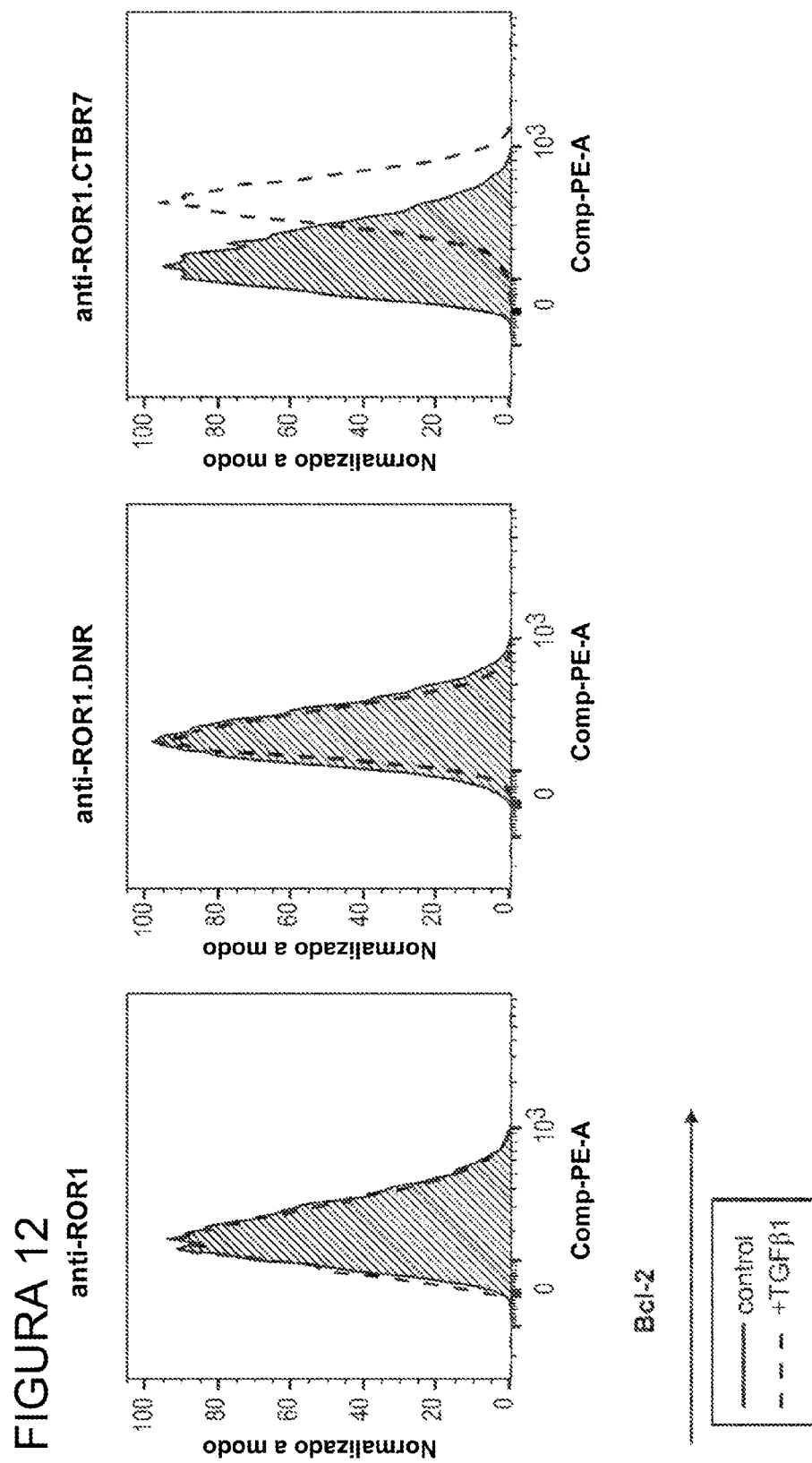
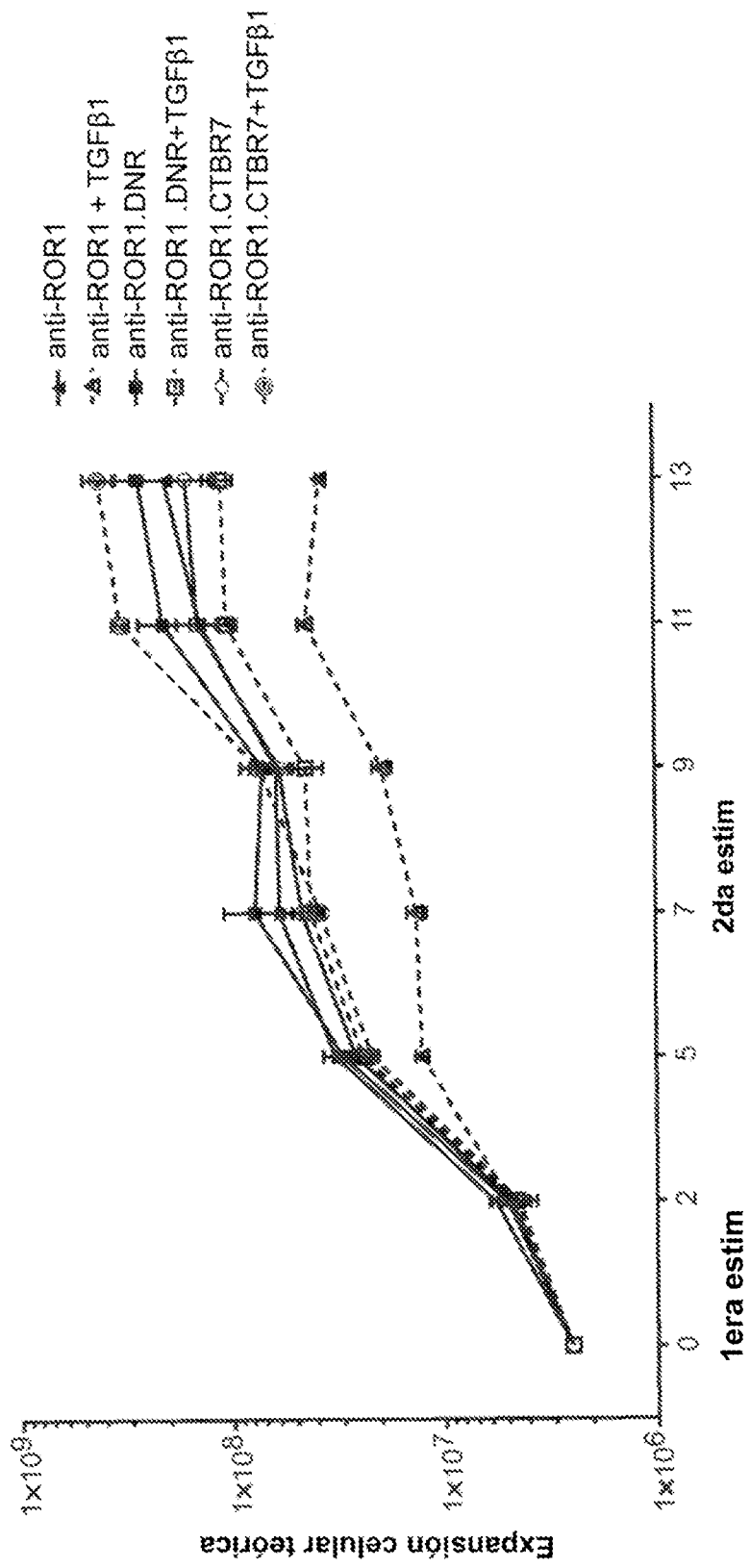
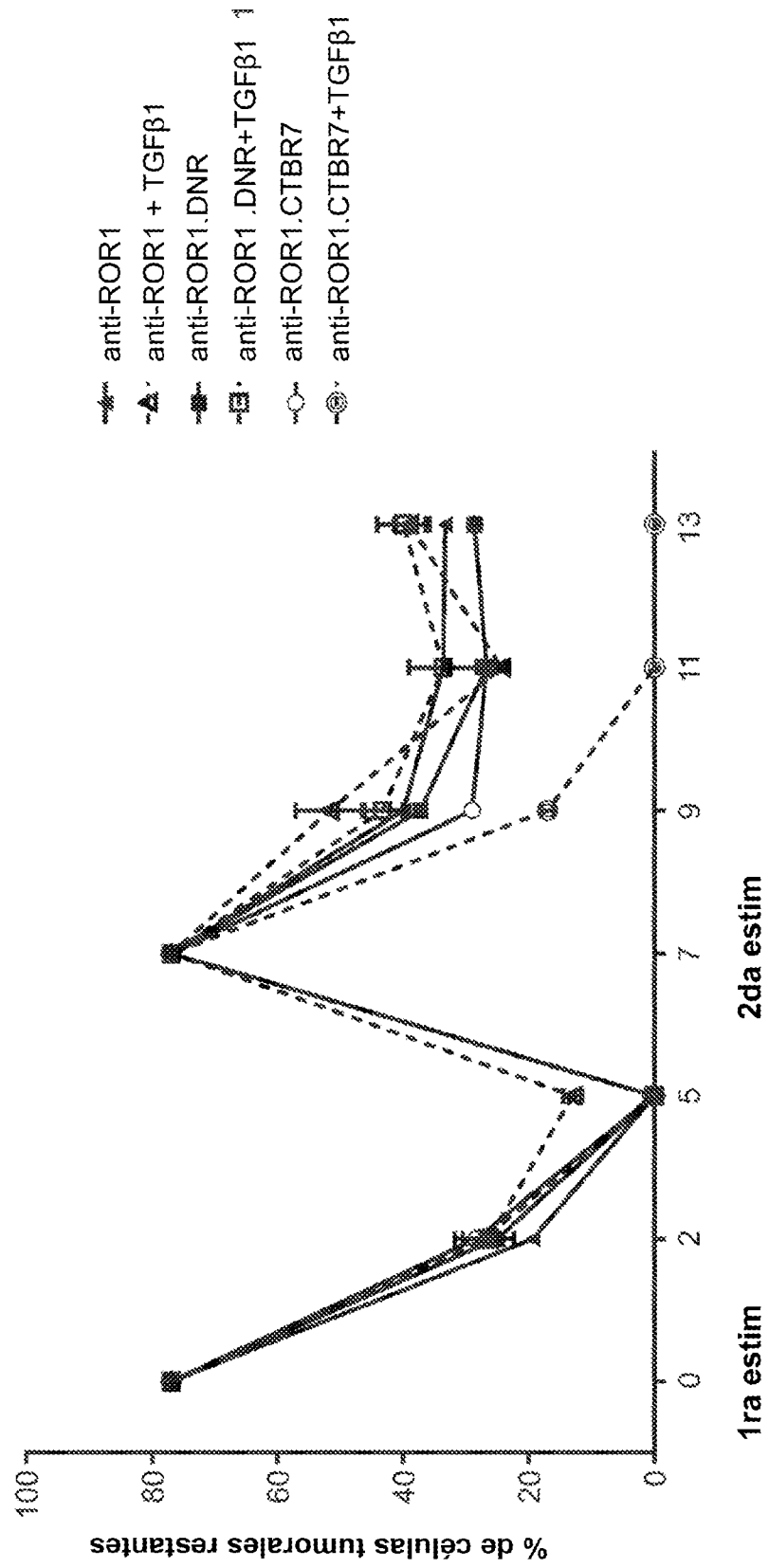


FIGURA 13



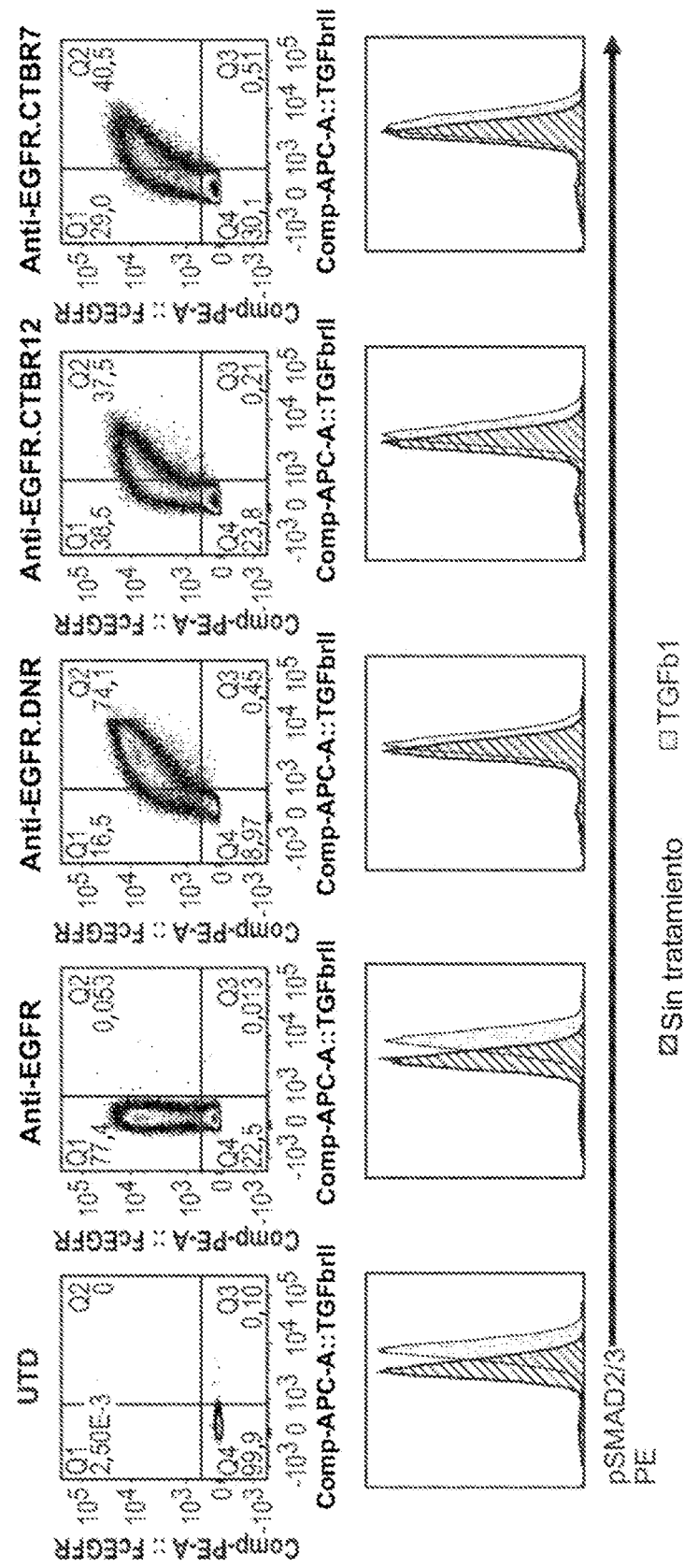
\*datos combinados de 3 donantes

FIGURA 14



\*datos combinados de 3 donantes

FIGURA 15



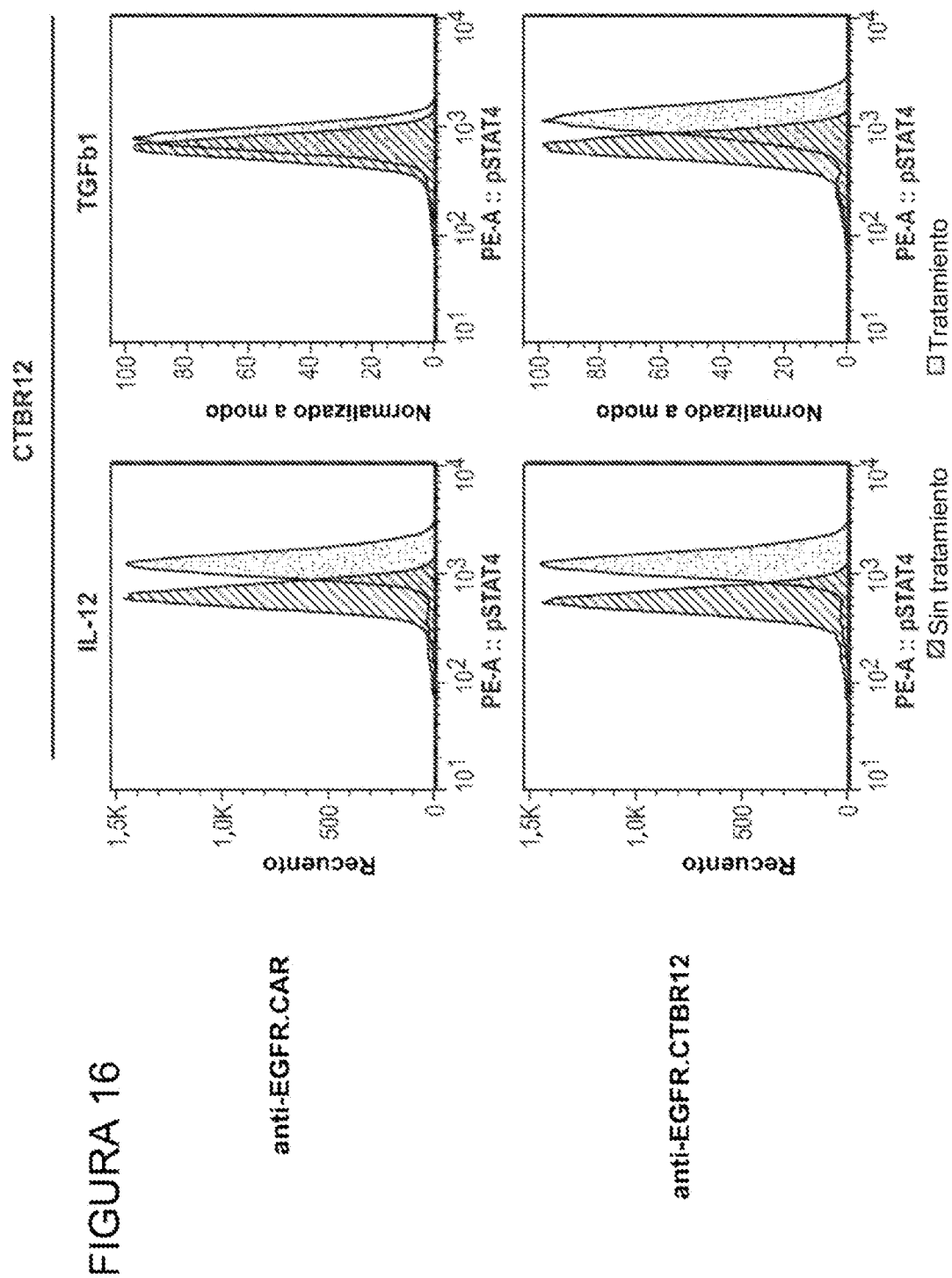
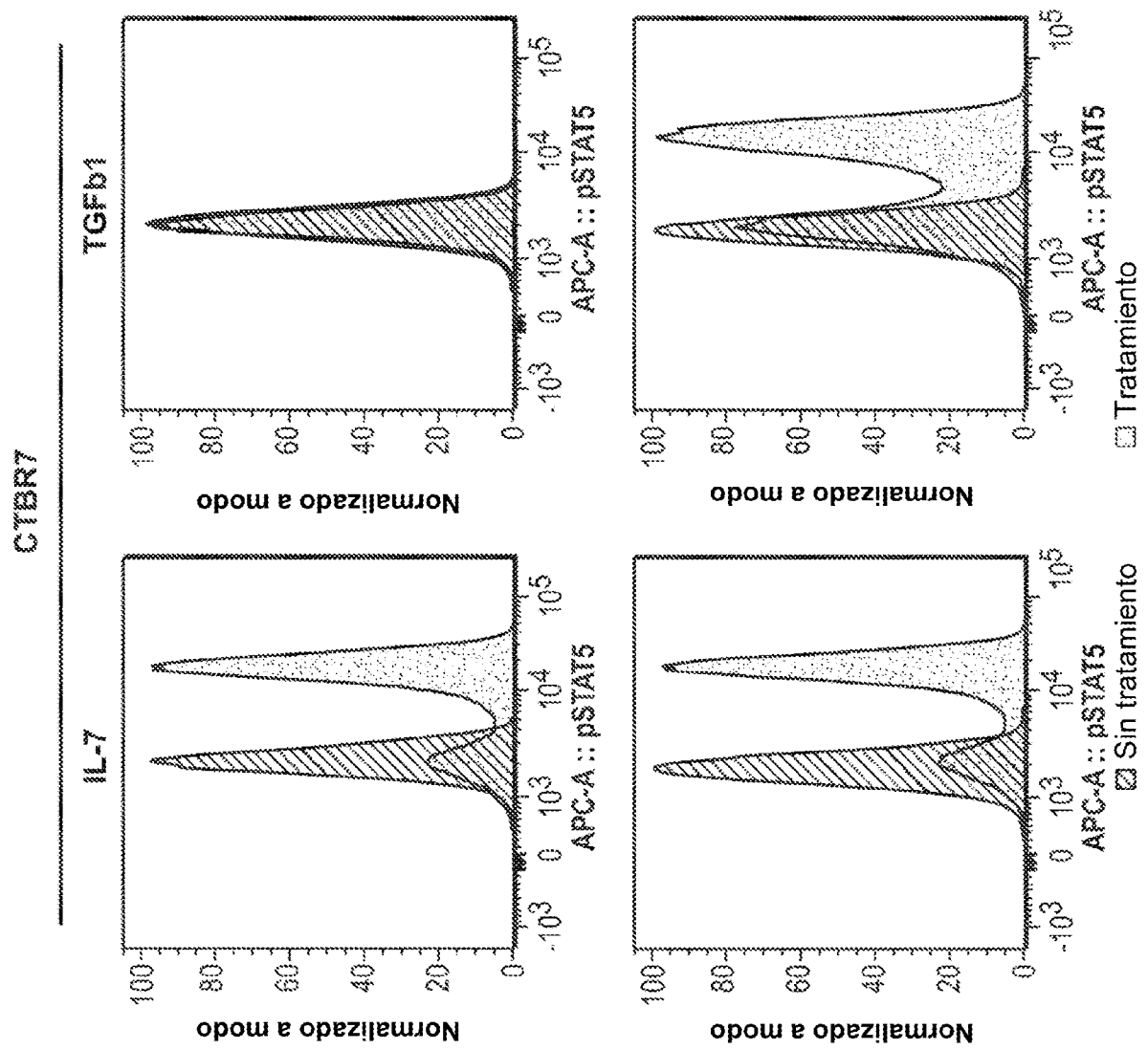


FIGURA 17

anti-EGFR.CAR



anti-EGFR.CTBR7



FIGURA 18

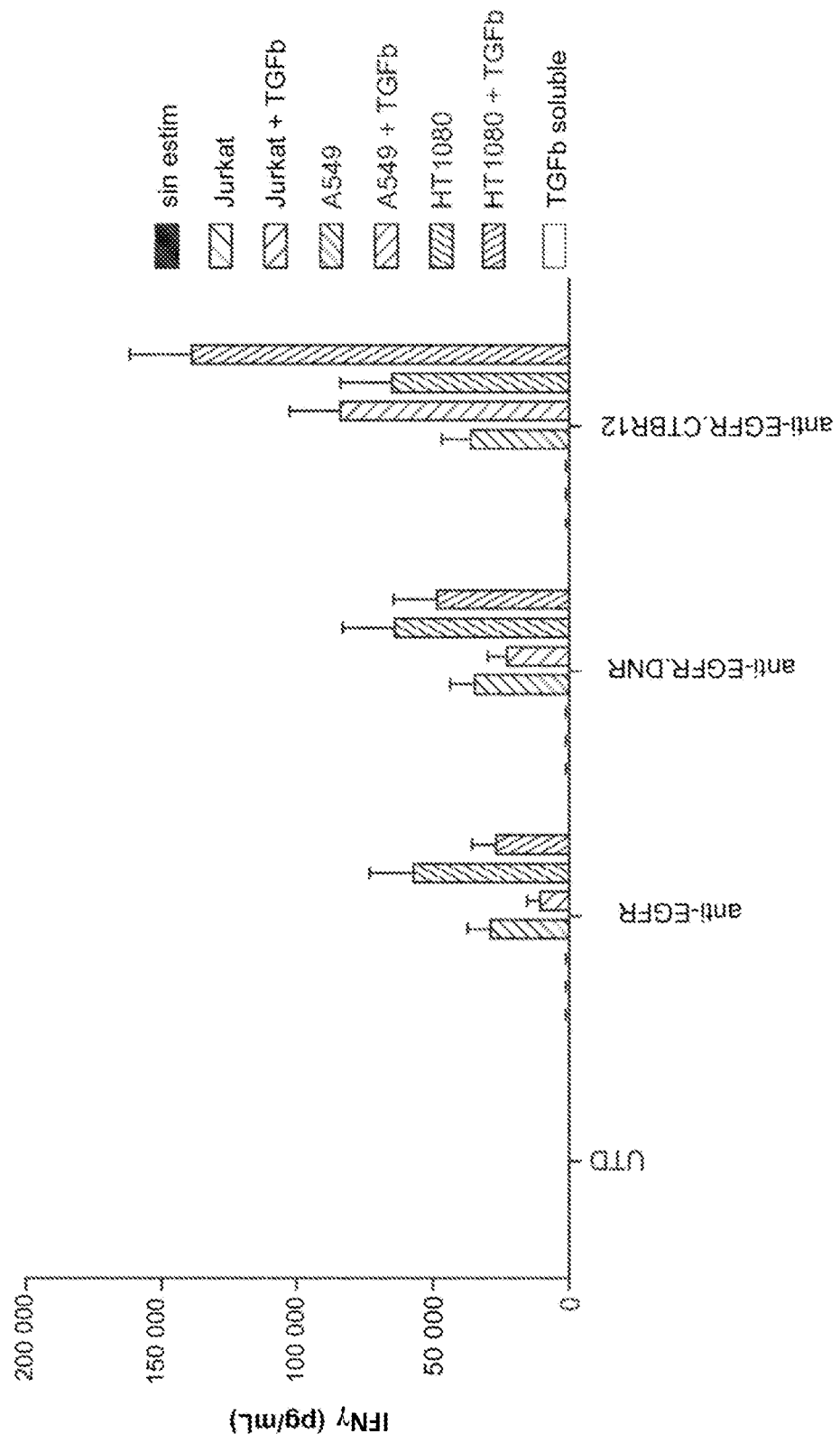


FIGURA 19

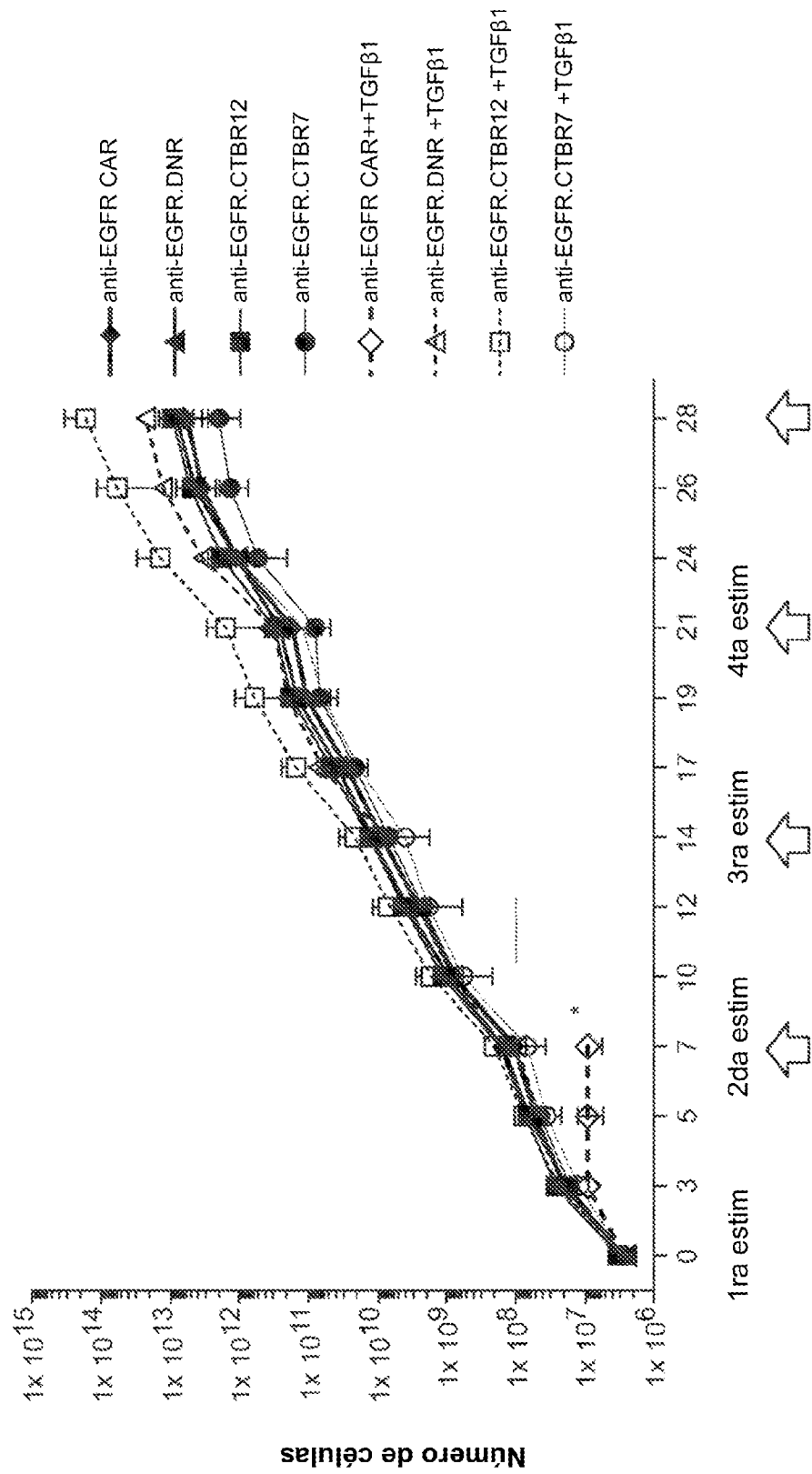
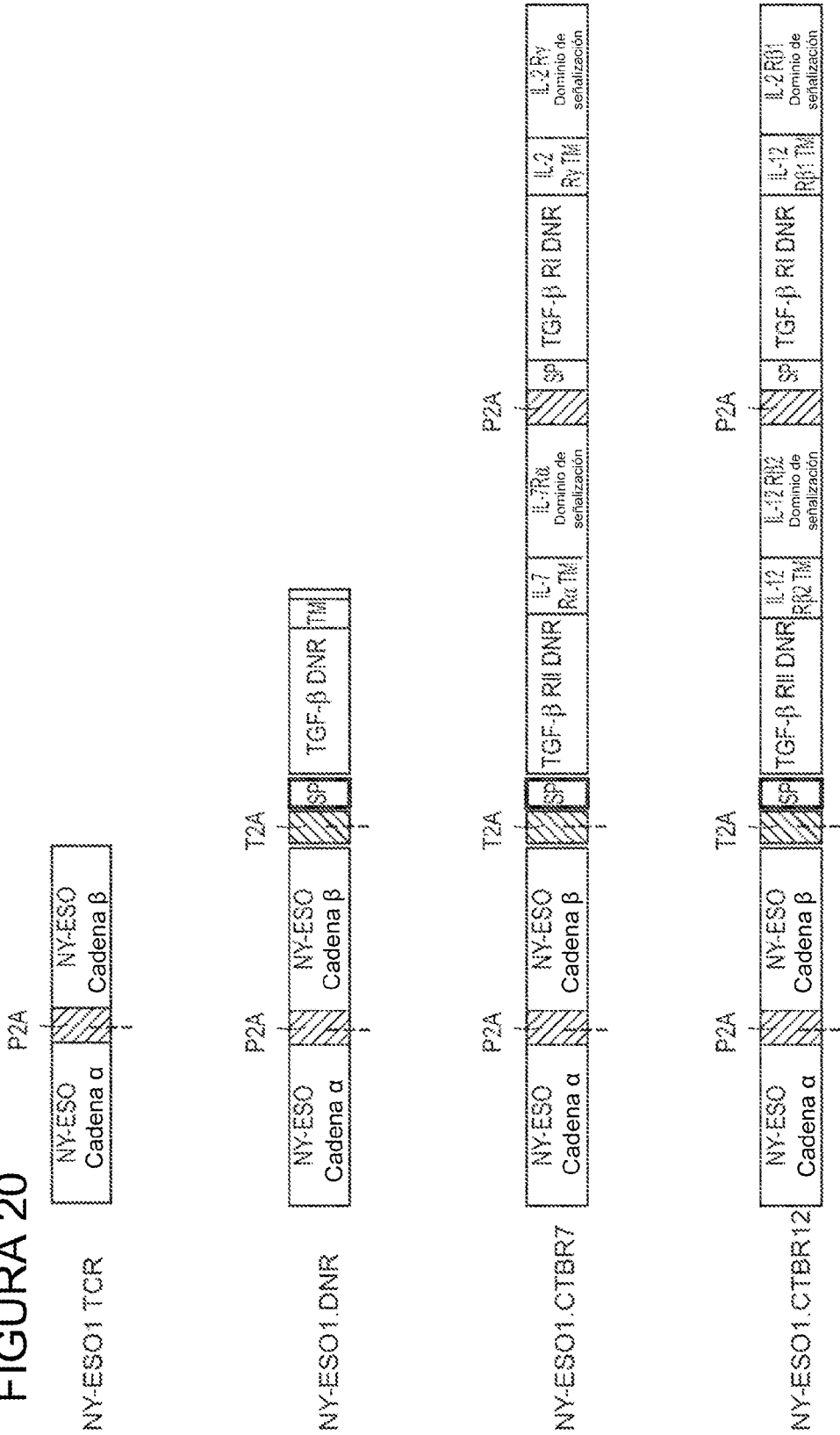
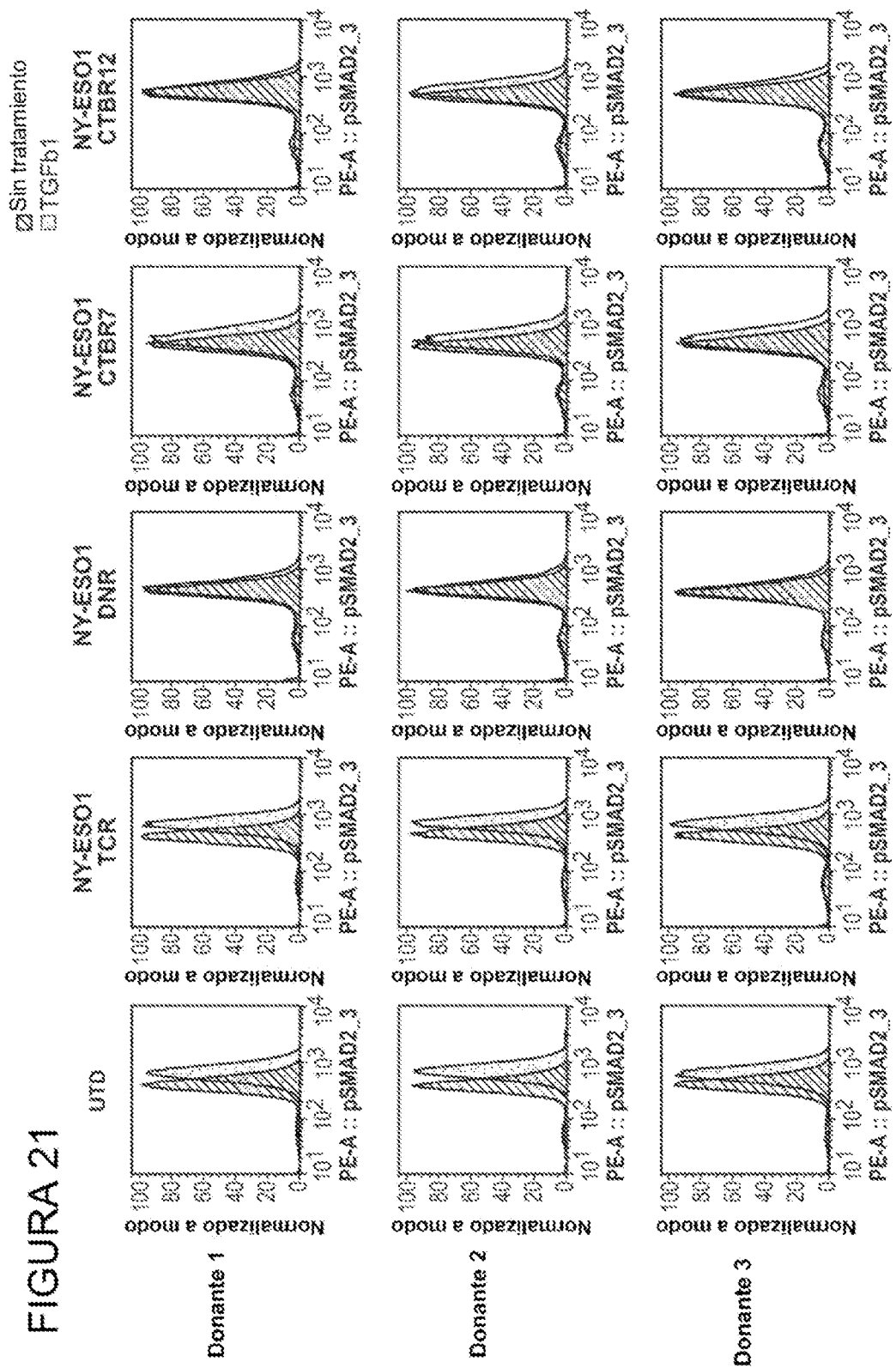


FIGURA 20





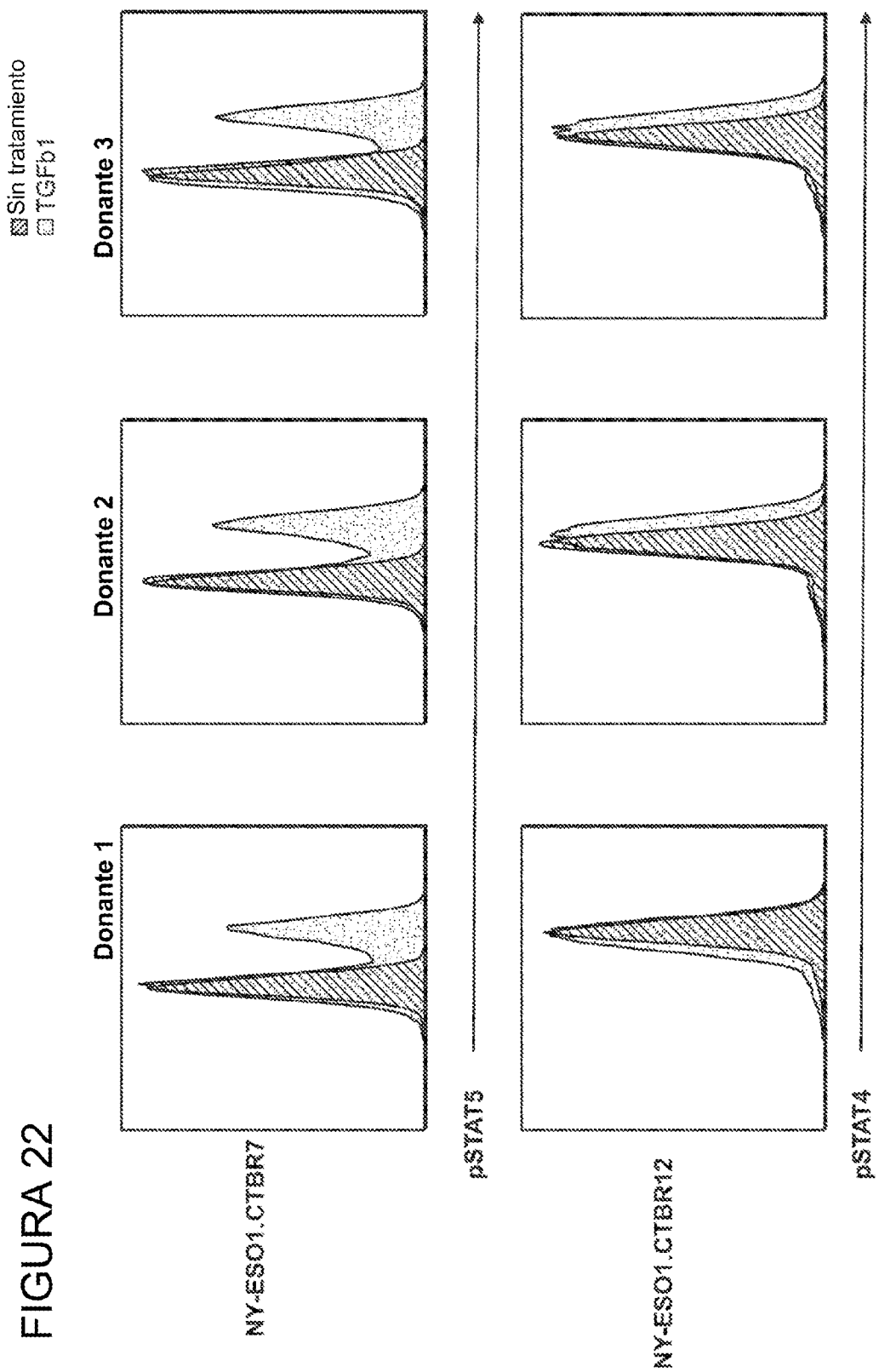


FIGURA 23

