

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 117**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/735 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2018** **PCT/EP2018/057566**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2018** **WO18177966**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2018** **E 18712231 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** **EP 3600407**

54 Título: **Receptores de unión a antígeno mejorados**

30 Prioridad:

27.03.2017 EP 17163090

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2025

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR;
MOESSNER, EKKEHARD;
KLEIN, CHRISTIAN y
DAROWSKI, DIANA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 3 010 117 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

Receptores de unión a antígeno mejorados

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere, en general, a receptores de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a dominios Fc mutados con unión al receptor de Fc reducida y a linfocitos T que expresan estos receptores de unión a antígeno. Más precisamente, la presente divulgación se refiere a linfocitos T transfectados/transducidos con un receptor de unión a antígeno que se recluta mediante unión específica a / interacción con el dominio Fc mutado de anticuerpos terapéuticos. Además, la presente divulgación describe un kit que comprende los linfocitos T de la invención y/o moléculas de ácido nucleico, vectores que expresan receptores de unión a antígeno de la presente invención y (un) anticuerpo(s) dirigido(s) a tumor que comprende(n) un dominio Fc mutado. La presente divulgación también describe la producción y el uso de linfocitos T en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades particulares junto con anticuerpos específicos de tumores, así como composiciones farmacéuticas / medicamentos que comprenden linfocitos T y/o anticuerpos terapéuticos, en el que los linfocitos T se han de administrar en combinación con anticuerpo(s) terapéutico(s) dirigido(s) a tumores que comprenden un dominio Fc mutado con unión al receptor de Fc reducida.

20 Antecedentes

El tratamiento adoptivo con linfocitos T (ACT) es un enfoque de tratamiento poderoso que usa linfocitos T específicos de cáncer (Rosenberg y Restifo, *Science* 348(6230) (2015), 62-68). El ACT puede usar células naturales específicas de tumor o linfocitos T que se volvieron específicos mediante genomanipulación usando receptores de linfocitos T o de antígenos quiméricos (Rosenberg y Restifo, *Science* 348(6230) (2015), 62-68). El ACT permite tratar e inducir con éxito la remisión en pacientes que padecen incluso enfermedades avanzadas y de otro modo resistentes al tratamiento, tales como leucemia linfocítica aguda, linfoma no hodgkiniano o melanoma (Dudley *et al.*, *J Clin Oncol* 26(32) (2008), 5233-5239; Grupp *et al.*, *N Engl J Med* 368 (16) (2013), 1509-1518; Kochenderfer *et al.*, *J Clin Oncol.* (2015) 33(6):540-549, doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025. publicación electrónica 25 ago 2014).

Sin embargo, a pesar de su impresionante eficacia clínica, el ACT está limitado por las toxicidades relacionadas con el tratamiento. La especificidad, y los efectos terapéuticos (*on-target*) y colaterales (*off-target*) resultantes, de los linfocitos T genomanipulados usados en ACT se impulsan principalmente por el resto de unión a antígeno dirigido al tumor implementado en el receptor quimérico para el antígeno (CAR). La expresión no exclusiva del antígeno tumoral o la diferencia temporal en el nivel de expresión pueden dar lugar a efectos secundarios graves o incluso a la cancelación del ACT debido a una toxicidad no tolerable del tratamiento.

Además, la disponibilidad de linfocitos T específicos de tumor para una lisis eficaz de las células tumorales depende de la supervivencia a largo plazo y de la capacidad de proliferación de los linfocitos T genomanipulados *in vivo*. Por otra parte, la supervivencia y proliferación de linfocitos T *in vivo* puede dar lugar a efectos no deseados a largo plazo debido a la persistencia de una respuesta a los linfocitos T-CAR no controlada (Grupp *et al.* 2013 *N Engl J Med* 368(16): 1509-18, Maude *et al.* 2014 *N Engl J Med* 371(16): 1507-17).

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

Sin embargo, los enfoques existentes tienen varias limitaciones. Las sinapsis inmunitarias que dependen de interruptores moleculares requieren la introducción de elementos adicionales que podrían provocar una respuesta inmunitaria o dar como resultado efectos colaterales no específicos. Además, la complejidad de estos sistemas multicomponente puede limitar la eficacia y la tolerabilidad del tratamiento. Por otra parte, la introducción de la estructura de marca en los anticuerpos monoclonales terapéuticos existentes puede afectar al perfil de eficacia y seguridad de estas construcciones.

En consecuencia, es necesario mejorar el tratamiento tumoral dirigido, en particular el tratamiento adoptivo con linfocitos T, para satisfacer las necesidades de los pacientes con cáncer. Por tanto, todavía existe la necesidad de proporcionar medios mejorados que tengan el potencial de mejorar la seguridad y la eficacia del ACT y superar las desventajas anteriores.

El documento WO 2015/179833 A1 divulga receptores quiméricos que comprenden una región de unión a Fc

correspondiente al dominio extracelular de CD64, un dominio transmembranario y dominios de señalización de linfocitos T intracelulares, y linfocitos T que expresan dichos receptores quiméricos. Schlothauer *et al.* Protein Eng. Des. Sel. 2016; 29(10):457-466 divulgan dominios Fc de IgG humana genomanipulados, incluyendo un dominio Fc variante "efector silencioso" que comprende las sustituciones P329G, L234A y L235A.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación también describe diversos aspectos y modos de realización que no se reivindican.

La presente divulgación se refiere, en general, a receptores de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a dominios Fc mutados con unión al receptor de Fc reducida y a linfocitos T que expresan estos receptores de unión a antígeno.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende un resto de unión a antígeno, en el que el resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio fragmento cristalizante (Fc) mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el dominio Fc mutado comprende al menos una sustitución aminoacídica en comparación con el dominio Fc original no mutado.

En un modo de realización, la unión al receptor de Fc del dominio Fc mutado se reduce en comparación con la unión al receptor de Fc del dominio Fc original no mutado, en particular cuando el receptor de Fc es un receptor de dominio Fc γ o receptor de Fc neonatal (FcRn). En un modo de realización, la unión al receptor de Fc se mide mediante resonancia de plasmón superficial (RPS) a 25 °C.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno es un scFv, un Fab, un crossFab o un scFab. En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un scFv. En otro modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un Fab o un crossFab.

En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje es un dominio transmembranario seleccionado del grupo que consiste en el dominio transmembranario de CD8, de CD3z, de FCGR3A, de NKG2D, de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 o de DAP12 o un fragmento del mismo.

En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje es el dominio transmembranario de CD28, en particular en el que el dominio transmembranario de anclaje comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además al menos un dominio de señalización estimulante y/o al menos un dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización, el al menos un dominio de señalización estimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD3z, de FCGR3A y de NKG2D, o fragmentos de los mismos. En un modo de realización, el al menos un dominio de señalización estimulante es un fragmento del dominio intracelular de CD3z, en particular, en el que el al menos un dominio de señalización estimulante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En un modo de realización, el al menos un dominio de señalización coestimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 y de DAP12, o fragmentos de los mismos. En un modo de realización, el al menos un dominio de señalización coestimulante es un fragmento del dominio intracelular de CD28. En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende un dominio de señalización estimulante que comprende el dominio intracelular de CD3z, o un fragmento del mismo, y en el que el receptor de unión a antígeno comprende un dominio de señalización coestimulante que comprende el dominio intracelular de CD28, o un fragmento del mismo. En un modo de realización, el dominio de señalización estimulante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y el dominio de señalización coestimulante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En un modo de realización, el dominio extracelular se conecta al dominio transmembranario de anclaje, opcionalmente a través de un conector peptídico. En un modo de realización, el conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS (SEQ ID NO: 17). En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje se conecta a un dominio de coseñalización o a un dominio de señalización, opcionalmente a través de un conector peptídico. En un modo de realización, se conectan los dominios de señalización y/o coseñalización, opcionalmente a través de al menos un conector peptídico.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno es un fragmento scFv, en el que el fragmento scFv se conecta en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, opcionalmente a través de un conector peptídico.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab o un fragmento crossFab, en el que

el fragmento Fab o crossFab se conecta en el extremo C de la cadena pesada al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, opcionalmente a través de un conector peptídico.

- 5 En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende un dominio de coseñalización, en el que el dominio de coseñalización se conecta en el extremo N al extremo C del dominio transmembranario de anclaje. En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende un dominio de señalización estimulante, en el que el dominio de señalización estimulante se conecta en el extremo N al extremo C del dominio de señalización coestimulante.
- 10 En un modo de realización, el dominio Fc original no mutado es un dominio Fc de IgG1 o de IgG4, en particular un dominio Fc de IgG1 humana. En un modo de realización, el dominio Fc mutado comprende al menos una mutación aminoacídica en una posición seleccionada del grupo que consiste en L234, L235, I253, H310, P331, P329 y H435 de acuerdo con la numeración EU, en particular en el que la mutación aminoacídica es L234A, L235A, I253A, N297A, H310A, P329G y/o H435A.
- 15 En un modo de realización, el dominio Fc mutado comprende al menos una mutación aminoacídica en una posición seleccionada del grupo que consiste en L234, L235 y P329 de acuerdo con la numeración EU, en particular las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("PGLALA").
- 20 En un modo de realización, el dominio Fc mutado comprende la mutación aminoacídica P329G de acuerdo con la numeración EU, en el que la unión al receptor de Fcγ del dominio Fc mutado se reduce en comparación con la unión al receptor de Fcγ del dominio Fc original no mutado, en particular en el que el receptor de Fcγ es FcγRIIIa y/o FcγRIIIa humano.
- 25 En un modo de realización, el dominio Fc mutado comprende al menos una mutación aminoacídica en una posición seleccionada del grupo que consiste en I253, H310 y H435 de acuerdo con la numeración EU, en particular las mutaciones aminoacídicas I253A, H310A y H435A ("AAA"), en el que la unión a FcRn del dominio Fc mutado se reduce en comparación con la unión a FcRn del dominio Fc original no mutado.
- 30 En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el resto de unión a antígeno comprende:
- 35 (i) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende
- (a) la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR H) 1 **RYWMN** (SEQ ID NO: 1);
- 40 (b) la secuencia de aminoácidos de CDR H2 **EITPDSSTINYTPSLKD** (SEQ ID NO: 2); y
- (c) la secuencia de aminoácidos de CDR H3 **PYDYGAWFAS** (SEQ ID NO: 3); y
- (ii) una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende
- 45 (d) la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR L) 1 **RSSTGAVTTSNYAN** (SEQ ID NO: 4);
- (e) la secuencia de aminoácidos de CDR L2 **GTNKRAP** (SEQ ID NO: 5); y
- 50 (f) la secuencia de aminoácidos de CDR L3 **ALWYSNHWV** (SEQ ID NO: 6).
- En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que
- 55 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 32 y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 33.
- 60 En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno comprende la región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 8 y la región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 9.
- 65 En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno es un scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G pero no se puede unir específicamente al dominio Fc

original no mutado, en el que el receptor de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 31. En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

5 En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el receptor de unión a antígeno comprende

10 a) un polipéptido de fusión de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 48; y

15 b) un polipéptido de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 50.

En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende

20 a) el polipéptido de fusión de la cadena ligera de SEQ ID NO: 39, y

b) el polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO: 41.

25 En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A ("AAA") pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el resto de unión a antígeno comprende:

(i) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende

30 (a) la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR H) 1 SYGMS (SEQ ID NO: 53);

(b) la secuencia de aminoácidos de CDR H2 SSGGSY (SEQ ID NO: 54); y

35 (c) la secuencia de aminoácidos de CDR H3 LGMITTCYAMDY (SEQ ID NO: 55); y

(ii) una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende

40 (d) la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR L) 1 RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO: 56);

(e) la secuencia de aminoácidos de CDR L2 KVSNRFS (SEQ ID NO: 57); y

45 (f) la secuencia de aminoácidos de CDR L3 PQGSIVPYT (SEQ ID NO: 58).

50 En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A ("AAA") pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62.

55 En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno comprende

a) la región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 61; y

b) la región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 62.

60 En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno es un scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A ("AAA") pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el receptor de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59. En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno

65 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el receptor de unión a antígeno comprende

a) un polipéptido de fusión de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y

b) un polipéptido de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende

a) el polipéptido de fusión de la cadena ligera de SEQ ID NO: 39, y

b) el polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO: 41.

En un modo de realización, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica el receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento. En un modo de realización, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de fusión de la cadena pesada o un polipéptido de la cadena ligera del receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento. En un modo de realización, se proporciona una composición que codifica el receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento, que comprende un primer polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de fusión de la cadena pesada y un segundo polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la cadena ligera.

En un modo de realización, se proporciona un polipéptido codificado por el polinucleótido como se describe en el presente documento o por la composición como se describe en el presente documento.

En un modo de realización, se proporciona un vector, en particular, un vector de expresión, que comprende el(los) polinucleótido(s) como se describe(n) en el presente documento.

En un modo de realización, se proporciona un linfocito T transducido que comprende el(los) polinucleótido(s) como se describe(n) en el presente documento o el vector como se describe en el presente documento. En un modo de realización, se proporciona un linfocito T transducido que puede expresar el receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento. En un modo de realización, se proporciona el linfocito T transducido como se describe en el presente documento, en el que el linfocito T transducido se cotransduce con un receptor de linfocitos T (TCR) que se puede unir específicamente a un antígeno diana.

En un modo de realización, se proporciona un kit que comprende

(A) un linfocito T transducido que puede expresar el receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento; y

(B) un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado;

en el que el receptor de unión a antígeno se puede unir específicamente al dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado.

En un modo de realización, se proporciona un kit que comprende

(A) un polinucleótido aislado que codifica el receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento; y

(B) un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado;

en el que el receptor de unión a antígeno se puede unir específicamente al dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado.

En un modo de realización, se proporciona un kit que comprende

(A) la composición o el vector como se describe en el presente documento que codifica el receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento; y

(B) un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado;

en el que el receptor de unión a antígeno se puede unir específicamente al dominio Fc mutado pero no se puede

unir específicamente al dominio Fc original no mutado.

En un modo de realización, el dominio Fc original no mutado es un dominio Fc de IgG1 o de IgG4, en particular un dominio Fc de IgG1 humana. En un modo de realización, se proporciona un dominio Fc mutado que comprende al menos una mutación aminoacídica en una posición seleccionada del grupo que consiste en L234, L235, I253, H310, P331, P329 y H435 de acuerdo con la numeración EU, en particular en el que la mutación aminoacídica es L234A, L235A, I253A, N297A, H310A, P329G y/o H435A. En un modo de realización, el dominio Fc mutado comprende al menos una mutación aminoacídica en una posición seleccionada del grupo que consiste en L234, L235 y P329 de acuerdo con la numeración EU, en particular las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("PGLALA"). En un modo de realización, el dominio Fc mutado comprende la mutación de aminoacídica P329G de acuerdo con la numeración EU. En un modo de realización, el dominio Fc mutado comprende al menos una mutación aminoacídica en una posición seleccionada del grupo que consiste en I253, H310 y H435 de acuerdo con la numeración EU, en particular las mutaciones aminoacídicas I253A, H310A y H435A ("AAA").

En un modo de realización, el anticuerpo que comprende el dominio Fc mutado se puede unir específicamente a un antígeno sobre la superficie de una célula tumoral, en particular en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en FAP, CEA, p95, BCMA, EpCAM, MSLN, MCSP, HER-1, HER-2, HER-3, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Fit3, FOLR1, Trop-2, CA-12-5, HLA-DR, MUC-1 (mucina), antígeno A33, PSMA, PSCA, receptor de transferrina, TNC (tenascina) y CA-IX, y/o a un péptido unido a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano. En un modo de realización, el anticuerpo que comprende el dominio Fc mutado se puede unir específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP), antígeno carcinoembrionario (CEA), mesotelina (MSLN), CD20, receptor de folato 1 (FOLR1) y tenascina (TNC).

En un modo de realización, se proporciona el kit como se describe en el presente documento para su uso como medicamento.

En un modo de realización, se proporciona el receptor de unión a antígeno o el linfocito T transducido como se describe en el presente documento para su uso como un medicamento, en el que el linfocito T transducido que expresa el receptor de unión a antígeno se administra antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado en el que el receptor de unión a antígeno se puede unir específicamente al dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado.

En un modo de realización, se proporciona el kit como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una neoplasia maligna. En un modo de realización, se proporciona el receptor de unión a antígeno o el linfocito T transducido como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una neoplasia maligna, en el que el tratamiento comprende la administración de un linfocito T transducido que expresa el receptor de unión a antígeno antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado en el que el receptor de unión a antígeno se puede unir específicamente al dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado.

En un modo de realización, dicha neoplasia maligna se selecciona de cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y cáncer hemático.

En un modo de realización, el linfocito T transducido se deriva de una célula aislada del sujeto al que se va a tratar. En un modo de realización, el linfocito T transducido no se deriva de una célula aislada del sujeto al que se va a tratar.

En un modo de realización, se proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un linfocito T transducido que puede expresar el receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento y administrar, antes de, simultáneamente con o después de la administración del linfocito T transducido, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado, en el que el receptor de unión a antígeno se puede unir específicamente al dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado. En un modo de realización, el linfocito T se aísla adicionalmente del sujeto y el linfocito T transducido se genera transduciendo el linfocito T aislado con el polinucleótido, la composición o el vector como se describe en el presente documento. En un modo de realización, el linfocito T se transduce con una construcción de vector retroviral o lentiviral o con una construcción de vector no viral. En un modo de realización, la construcción del vector no viral es un vector minicircular basado en el transposón *Sleeping Beauty*.

En un modo de realización, el linfocito T transducido se administra al sujeto mediante infusión intravenosa. En un modo de realización, el linfocito T transducido se pone en contacto con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 antes de su administración al sujeto. En un modo de realización, el linfocito T transducido se pone en contacto con al menos una citocina antes de la administración al sujeto, preferentemente con interleucina-2 (IL-2), interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15) y/o interleucina-21, o variantes de las mismas.

En un modo de realización, la enfermedad es una neoplasia maligna. En un modo de realización, la neoplasia maligna se selecciona de cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y cáncer hemático.

En un modo de realización, se proporciona un procedimiento para inducir la lisis de una célula diana, que comprende poner en contacto la célula diana con un linfocito T transducido que puede expresar el receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento en presencia de un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado, en el que el receptor de unión a antígeno se puede unir específicamente al dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado.

En un modo de realización, la célula diana es una célula cancerosa. En un modo de realización, la célula diana expresa un antígeno seleccionado del grupo que consiste en FAP, CEA, p95, BCMA, EpCAM, MSLN, MCSP, HER-1, HER-2, HER-3, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, FOLR1, Trop-2, CA-12-5, HLA-DR, MUC-1 (mucina), antígeno A33, PSMA, PSCA, receptor de transferrina, TNC (tenascina) y CA-IX. En un modo de realización, la célula diana expresa un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno carcinoembrionario (CEA), mesotelina (MSLN), CD20, receptor de folato 1 (FOLR1) y tenascina (TNC).

En un modo de realización, los polinucleótidos o el linfocito T transducido como se describe en el presente documento se usan para la fabricación de un medicamento. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de una neoplasia maligna.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa la arquitectura de receptores de unión a antígeno ejemplares de acuerdo con la presente divulgación. La figura 1A muestra la arquitectura del formato anti-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD y del formato anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD. Se representa el dominio extracelular que comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G. El resto de unión a antígeno consiste en una cadena pesada variable y una cadena ligera variable. Ambas se conectan por un conector (Gly₄Ser)₄. Unido a la cadena ligera variable, un conector Gly₄Ser conecta el dominio de reconocimiento de antígeno con el dominio transmembranario (TM) de CD28 que se fusiona al dominio de señalización coestimulante (CSD) intracelular de CD28, que a su vez se fusiona al dominio de señalización estimulante (SSD) de CD3z. La figura 1B muestra la arquitectura del formato anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD y anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD. Se representa el dominio extracelular que comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G. El resto de unión a antígeno consiste en una cadena pesada de Ig y una cadena ligera de Ig. Unido a la cadena pesada, un conector Gly₄Ser conecta el dominio de reconocimiento de antígeno con el dominio transmembranario de CD28 que se fusiona al dominio de señalización coestimulante intracelular de CD28, que a su vez se fusiona al dominio de señalización estimulante de CD3z.

La figura 2 representa una representación esquemática que ilustra la composición modular de construcciones de expresión ejemplares que codifican receptores de unión a antígeno de la presente divulgación. La figura 2A muestra un formato scFv dirigido a P392G. La figura 2B muestra un formato Fab dirigido a P392G.

La figura 3 representa una molécula de IgG1 ejemplar que alberga la mutación P329G en el dominio Fc que es reconocido por un receptor de unión a antígeno anti-P329G de la presente divulgación.

La figura 4 representa una representación esquemática de una IgG unida a un antígeno asociado a tumor (TAA) que alberga la mutación P329G. Este anticuerpo se puede, a su vez, reconocer por un linfocito T que expresa el receptor de unión a antígeno anti-P329G, con lo que el linfocito T se activa.

La figura 5 muestra una representación esquemática de un ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT. La IgG unida a TAA que alberga la mutación P329G se puede reconocer por el linfocito T Jurkat NFAT que expresa el receptor de unión a antígeno anti-P329G. Este reconocimiento da lugar a la activación de la célula que se puede detectar midiendo la luminiscencia (cps).

La figura 6 representa el ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales SUDHDL4 que expresan CD20 como células diana. Se usó un anticuerpo anti-IgG CD20 (GA101) que alberga la mutación P329G, que, por una parte, reconoce el antígeno asociado a tumor y, por otra parte, es reconocido por linfocitos T Jurkat NFAT que expresan receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación. En la figura 6A, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras. En la figura 6B, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras.

La figura 7 representa el ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales CD20 como células diana. Se usó un anticuerpo anti-IgG CD20 (GA101) que alberga la mutación P329G, que reconoce el antígeno asociado a tumor y es reconocido por linfocitos T Jurkat NFAT que expresan receptores de unión a antígeno de

acuerdo con la presente divulgación. En la figura 7A, se usó el clon 5 único de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras y las células WSUDLCL2 como células tumorales. En la figura 7B, se usó el clon 2 único de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras y las células WSUDLCL2 como células tumorales. En la figura 7C, se usó el clon 5 único de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras y las células SUDHL4 como células tumorales. En la figura 7D, se usó el clon 2 único de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras y las SUDHL4 como células tumorales.

La figura 8 representa el ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT realizado usando células tumorales NIH/3T3-huFAP cl 19 que expresan FAP adherentes como células diana. Se usó el clon 4B9 del anticuerpo anti-IgG FAP que alberga la mutación P329G, que reconoce el antígeno asociado a tumor y es reconocido por linfocitos T Jurkat NFAT que expresan receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación. Se incluyó IgG de DP47/vk3 que alberga la mutación P329G como control de isotipo. En la figura 8A, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras. En la figura 8B, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras. En la figura 8C, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras. En la figura 8D, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras.

La figura 9 representa el ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales MKN45 que expresan CEA adherente como células diana. Se usó el clon A5B7 anti-IgG CEA o bien el clon T84 LCHA anti-IgG CEA, albergando ambos la mutación P329G, que reconocen el antígeno asociado a tumor y son reconocidos por los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación. Se incluyó además IgG de DP47/vk3 que alberga la mutación P329G como control de isotipo. En la figura 9A y en la figura 9B, se usó una población separada de linfocitos T NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras. En la figura 9C y en la figura 9D, se usó una población separada de linfocitos T NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras.

La figura 10 representa el ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales MKN45 que expresan CEA adherente como células diana. Se usó el clon CH1A1A 98 99 anti-IgG CEA o bien el clon hMN14 anti-IgG CEA, albergando ambos la mutación P329G, que reconocen el antígeno asociado a tumor y son reconocidos por los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación. Se incluyó además IgG de DP47/vk3 que alberga la mutación P329G como control de isotipo. En la figura 10A y en la figura 10B, se usó una población separada de linfocitos T NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras. En la figura 10C y en la figura 10D, se usó una población separada de linfocitos T NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras.

La figura 11 representa el ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales CT26TNC cl 19 que expresan TNC adherente como células diana. Se usó el clon A2B10 anti-IgG TNC que alberga la mutación P329G como anticuerpo anti-IgG que reconoce el antígeno asociado a tumor y es reconocido por linfocitos T Jurkat NFAT que expresan receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación. Se incluyó además IgG de DP47/vk3 que alberga la mutación P329G como control de isotipo. En la figura 11A y en la figura 11B, se usó una población separada de linfocitos T NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras. En la figura 11C y en la figura 11D, se usó una población separada de linfocitos T NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras.

La figura 12A y la figura 12B representan el ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales CT26TNC cl 19 que expresan TNC adherente como células diana. Se usó el clon A2B10 anti-IgG TNC que alberga la mutación P329G, que reconoce el antígeno asociado a tumor y es reconocido por linfocitos T Jurkat NFAT que expresan receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación. Se incluyó además IgG de DP47/vk3 que alberga la mutación P329G como control de isotipo. Se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras.

La figura 13 representa el ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales CD20 como células diana. Se usó un anticuerpo anti-IgG CD20 (GA101) que alberga la mutación P329G y la mutación LALA, una mutación P329G y D265A, la mutación LALA sola o ninguna mutación para detectar el antígeno asociado a tumor y es reconocido por los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación. En la figura 13A, se usó la población celular de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras y las células SUDHL4 como células tumorales. En la figura 13B, se usó la población celular de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras y las células SUDHL4 como células tumorales.

La figura 14 representa el ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales CD20 como

células diana. Se usó un anticuerpo anti-IgG CD20 (GA101) que alberga la mutación P329G y la mutación LALA, una mutación P329G sola, la mutación LALA sola o ninguna mutación para detectar el antígeno asociado a tumor y es reconocido por los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación. En la figura 14A, se usó la población celular de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras y las células SUDHL4 como células tumorales. En la figura 14B, se usó la población celular de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células efectoras y las células SUDHL4 como células tumorales.

Descripción detallada

Definiciones

Los términos se usan en el presente documento como se usan en general en la técnica, a menos que se defina de otro modo en lo que sigue. Un "receptor de Fc activador" es un receptor de Fc que, tras el acoplamiento por un dominio Fc de un anticuerpo, provoca acontecimientos de señalización que estimulan a la célula portadora del receptor para que realice funciones efectoras. Los receptores de Fc activadores humanos incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89).

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC") es un mecanismo inmunitario que da lugar a la lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las que se unen específicamente anticuerpos o derivados de los mismos que comprenden una región Fc, en general, por medio de la parte proteica que es N terminal a la región Fc. Como se usa en el presente documento, el término "ADCC reducida" se define como una reducción en el número de células diana que se lisan en un tiempo dado, a una concentración de anticuerpo dada en el medio circundante a las células diana, por el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o bien un incremento en la concentración de anticuerpo en el medio circundante a las células diana, requerido para lograr la lisis de un número dado de células diana en un tiempo dado, por el mecanismo de ADCC. La reducción en la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos procedimientos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándar (que son conocidos para los expertos en la técnica), pero que no se ha mutado. Por ejemplo, la reducción en ADCC mediada por un anticuerpo que comprende, en su dominio Fc, una mutación aminoacídica que reduce la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución aminoacídica en el dominio Fc. Los ensayos adecuados para medir la ADCC son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 2006/082515 o la publicación PCT n.º WO 2012/130831).

Una "cantidad eficaz" de un agente (por ejemplo, un anticuerpo) se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un receptor) y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, un resto de unión a antígeno y un antígeno y/o un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X por su compañero Y, en general, se puede representar por la constante de disociación (K_d), que es la proporción de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_d y k_a, respectivamente). Por tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la proporción de las constantes de velocidad permanezca igual. La afinidad se puede medir por procedimientos bien establecidos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Un procedimiento preferente para medir la afinidad es la resonancia de plasmón superficial (RPS) y una temperatura preferente para la medición es 25 °C.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de forma similar a un aminoácido natural. Los aminoácidos se pueden denominar en el presente documento por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

El término "mutación aminoacídica", como se usa en el presente documento, quiere decir que engloba sustituciones, delecciones, inserciones y modificaciones aminoacídicas. Se puede realizar cualquier combinación de sustitución, delección, inserción y modificación para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc. Las delecciones e

inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen delecciones e inserciones de aminoácidos amino y/o carboxiterminales. Mutaciones aminoacídicas particulares son sustituciones aminoacídicas. Con el propósito de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, son en particular preferentes las sustituciones aminoacídicas no conservadoras, es decir, el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones aminoacídicas incluyen el reemplazo por aminoácidos no naturales o por derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Se pueden generar mutaciones aminoacídicas usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida a sitio, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que también pueden ser útiles procedimientos de alteración del grupo de cadena lateral de un aminoácido por procedimientos distintos de genomaniplación, tales como modificación química. Se pueden usar diversas designaciones en el presente documento para indicar la misma mutación aminoacídica. Por ejemplo, se puede indicar una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc a glicina como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada. En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina completas, así como a partes de dichas moléculas de inmunoglobulina. Además, el término se refiere, como se analiza en el presente documento, a moléculas de anticuerpo modificadas y/o alteradas, en particular a moléculas de anticuerpo mutadas. El término también se refiere a anticuerpos sintetizados o generados de forma recombinante o sintética. En el contexto de la presente divulgación, el término anticuerpo se usa de manera intercambiable con el término inmunoglobulina.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de dominio único. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückerthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Ejemplos de moléculas de unión a antígeno son inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo, fragmentos, de las mismas, así como receptores de unión a antígeno y derivados de los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "resto de unión a antígeno" se refiere a una molécula polipeptídica que se une específicamente a un determinante antigénico. En un modo de realización, un resto de unión a antígeno puede dirigir la entidad a la que se fija (por ejemplo, una inmunoglobulina o un receptor de unión a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que lleva el determinante antigénico o a una inmunoglobulina que se une al determinante antigénico en una célula tumoral. En otro modo de realización, un resto de unión a antígeno puede activar la señalización a través de su antígeno diana, por ejemplo, la señalización se activa tras la unión de un determinante antigénico a un receptor de unión a antígeno en un linfocito T. En el contexto de la presente divulgación, los restos de unión a antígeno se pueden incluir en anticuerpos y fragmentos de los mismos, así como en receptores de unión a antígeno y fragmentos de los mismos como se define además en el presente documento. Los restos de unión a antígeno incluyen un dominio de unión a antígeno, que comprende una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina. En determinados modos de realización, los restos de unión a antígeno pueden comprender regiones constantes de inmunoglobulina, como se define además en el presente documento y es conocido en la técnica. Las regiones constantes de la cadena pesada útiles incluyen cualquiera de los cinco isotipos: α , δ , ϵ , γ o μ . Las regiones constantes de la cadena ligera útiles incluyen cualquiera de los dos isotipos: κ y λ .

En el contexto de la presente divulgación, el término "receptor de unión a antígeno" se refiere a una molécula de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que

comprende al menos un resto de unión a antígeno. Un receptor de unión a antígeno se puede preparar con partes polipeptídicas de diferentes fuentes. En consecuencia, también se puede entender como una "proteína de fusión" y/o una "proteína quimérica". Normalmente, las proteínas de fusión son proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes (o, preferentemente, ADNc) que originalmente codificaban proteínas separadas. La traducción de este gen de fusión (o ADNc de fusión) da como resultado un único polipéptido, preferentemente con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. Las proteínas de fusión recombinantes se crean artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante para su uso en investigación biológica o en tratamientos. A continuación en el presente documento se describen otros detalles sobre los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación. En el contexto de la presente divulgación, se entiende que un CAR (receptor quimérico de antígeno) es un receptor de unión a antígeno que comprende una porción extracelular que comprende un resto de unión a antígeno fusionado por una secuencia espaciadora a un dominio transmembranario de anclaje que se fusiona, a su vez, a los dominios de señalización intracelulares de CD3z y CD28.

Un "sitio de unión a antígeno" se refiere al sitio, es decir, uno o más residuos aminoacídicos, de una molécula de unión a antígeno que proporciona interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo o un receptor de unión a antígeno comprende residuos aminoacídicos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Una molécula de inmunoglobulina natural típicamente tiene dos sitios de unión a antígeno, una molécula Fab o una scFv típicamente tiene un único sitio de unión a antígeno.

El término "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo o un receptor de unión a antígeno que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria de parte o todo un antígeno. Se puede proporcionar un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, por uno o más dominios variables de inmunoglobulina (también llamados regiones variables). En particular, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL) y una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH).

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina que está implicado en la unión al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt *et al.*, Kuby Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un dominio VH o VL único es normalmente suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

El término "ATD", como se usa en el presente documento, se refiere a un "dominio transmembranario de anclaje" que define un tramo de polipéptido que se puede integrar en la(s) membrana(s) celular(es) de una célula. El ATM se puede fusionar con otros dominios polipeptídicos extracelulares y/o intracelulares, en los que estos dominios polipeptídicos extracelulares y/o intracelulares también estarán confinados en la membrana celular. En el contexto de los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación, el ATM confiere fijación a la membrana y confinamiento del receptor de unión a antígeno de la presente divulgación. Los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación comprenden al menos un ATM y un dominio extracelular que comprende un resto de unión a antígeno. Adicionalmente, el ATM se puede fusionar con otros dominios de señalización intracelulares.

El término "unión a", tal como se usa en el contexto de los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación, define una unión (interacción) de un "sitio de interacción con antígeno" y un antígeno entre sí. El término "sitio de interacción con antígeno" define, de acuerdo con los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación, un motivo de un polipéptido que muestra capacidad de interacción específica con un antígeno específico o un grupo específico de antígenos (es decir, dominios Fc mutados). Dicha unión/interacción se entiende también para definir un "reconocimiento específico". El término "reconocer específicamente" significa, de acuerdo con la presente divulgación, que el receptor de unión a antígeno puede interactuar específicamente con y/o unirse a una molécula modificada como se define en el presente documento, mientras que la molécula no modificada no es reconocida. El resto de unión a antígeno de un receptor de unión a antígeno puede reconocer, interactuar y/o unirse a diferentes epitopos en la misma molécula. Este término se refiere a la especificidad del receptor de unión a antígeno, es decir, a su capacidad para discriminar entre las regiones específicas de una molécula modificada, es decir, un dominio Fc mutado, como se define en el presente documento. La interacción específica del sitio de interacción con antígeno con su antígeno específico puede dar como resultado el inicio de una señal, por ejemplo, debido a la inducción de un cambio en la conformación del polipéptido que comprende el antígeno, una oligomerización del polipéptido que comprende el antígeno, una oligomerización del receptor de unión a antígeno, etc. Por tanto, un motivo específico en la secuencia de aminoácidos del sitio de interacción con antígeno y el antígeno se unen entre sí como resultado de su estructura primaria, secundaria o terciaria, así como el resultado de modificaciones secundarias de dicha estructura. En consecuencia, el término "unión a" no solo se refiere a un epitopo lineal sino que también se puede referir a un epitopo conformacional, un epitopo estructural o un epitopo discontinuo que consiste en dos regiones de las moléculas diana o partes de las mismas. En el contexto de la presente divulgación, un epitopo conformacional se define por dos o más secuencias de aminoácidos discretas separadas en la secuencia primaria que se unen entre sí sobre la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega a la proteína nativa (Sela, Science 166 (1969), 1365 y Laver, Cell 61 (1990), 553-536). Además, el término "unirse a" se usa de manera intercambiable en el contexto de la presente divulgación con el término "interactuar

con". La capacidad del resto de unión a antígeno (por ejemplo, un dominio Fab o scFv) de un receptor de unión a antígeno o un anticuerpo para unirse a un determinante antigénico diana específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (RPS) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En un modo de realización, el grado de unión de un resto de unión a antígeno a una proteína no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del resto de unión a antígeno al antígeno diana como se mide, en particular, por RPS. En determinados modos de realización, un resto de unión a antígeno que se une al antígeno diana tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). El término "unión específica", como se usa de acuerdo con la presente divulgación, significa que las moléculas de la presente divulgación no reaccionan o no reaccionan esencialmente de forma cruzada con (poli) péptidos de estructuras similares, es decir, con un dominio Fc original no mutado, en el que un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado. En consecuencia, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación se une específicamente a / interactúa con un dominio Fc mutado. Se puede someter a prueba la reactividad cruzada de un panel de construcciones en investigación, por ejemplo, evaluando la unión de un panel de restos de unión a antígeno en condiciones convencionales (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988) y "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1999)) al dominio Fc mutado de interés, así como al dominio Fc no mutado original. Solo aquellas construcciones (es decir, fragmentos Fab, scFv y similares) que se unen al dominio Fc mutado de interés pero no se unen o no se unen esencialmente a un dominio Fc original no mutado se consideran específicas para el dominio Fc mutado de interés y se seleccionan para estudios adicionales de acuerdo con el procedimiento proporcionado en el presente documento. Estos procedimientos pueden comprender, entre otros, estudios de unión, estudios de bloqueo y competición con dominios Fc estrechamente relacionados estructural y/o funcionalmente. Los estudios de unión también comprenden análisis FACS, resonancia de plasmón superficial (RPS, por ejemplo, con BIAcore®), ultracentrifugación analítica, calorimetría de valoración isotérmica, anisotropía de fluorescencia, espectroscopia de fluorescencia o ensayos de unión a ligandos radiomarcados.

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

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

El término "receptor quimérico de antígeno" o "receptor quimérico" o "CAR" se refiere a un receptor de unión a antígeno constituido por una porción extracelular de un resto de unión a antígeno (por ejemplo, un dominio de anticuerpo monocatenario) fusionado por una secuencia espaciadora a los dominios de señalización intracelulares de CD3z y CD28. La presente divulgación proporciona adicionalmente receptores de unión a antígeno en los que el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab o uno crossFab. El término "CAR" se entiende en su forma más amplia como que comprende receptores de unión a antígeno constituidos por una porción extracelular que comprende un resto de unión a antígeno fusionado a CD3z y un fragmento del mismo y a CD28 y fragmentos del mismo, opcionalmente a través de uno o varios conectores peptídicos.

La "clase" de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

Por una "molécula Fab de entrecruzamiento" (también denominada "crossfab" o "fragmento Fab de entrecruzamiento") se quiere decir una molécula Fab en la que se intercambian las regiones variables o las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de Fab, es decir, la molécula de crossFab comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera y la región constante de la cadena pesada, y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera. Por claridad, en un fragmento crossFab en el que se intercambian las regiones variables de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab, la cadena peptídica que comprende la región constante de la cadena pesada se denomina en el presente documento "cadena pesada" de la molécula Fab de entrecruzamiento. A la inversa,

en un fragmento crossFab en el que se intercambian las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab, la cadena peptídica que comprende la región variable de la cadena pesada se denomina en el presente documento "cadena pesada" del fragmento crossFab. En consecuencia, un fragmento crossFab comprende una cadena pesada o ligera compuesta por la región variable de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera (VH-CL) y una cadena pesada o ligera compuesta por la región variable de la cadena ligera y la región constante de la cadena pesada (VL-CH1). Al contrario que esto, por una molécula "Fab convencional" se quiere decir una molécula Fab en su formato natural, es decir, que comprende una cadena pesada compuesta por las regiones variable y constante de la cadena pesada (VH-CH1) y una cadena ligera compuesta por las regiones variable y constante de la cadena ligera (VL-CL).

El término "CSD", como se usa en el presente documento, se refiere al dominio de señalización coestimulante.

El término "funciones efectoras" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión al receptor de Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos, regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Como se usa en el presente documento, se considera que los términos "genomanipular", "genomanipulado", "genomanipulación" incluyen cualquier manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La genomanipulación incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques.

El término "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. En determinados modos de realización, el casete de expresión de la presente divulgación comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno de la presente divulgación o fragmentos de las mismas.

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

El término "dominio Fc" o "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los delimitadores de la región Fc de una cadena pesada de IgG podrían variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente por extenderse desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de "numeración EU", también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Una "subunidad" de un dominio Fc, como se usa en el presente documento, se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes C terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, que se puede autoasociar de forma estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio Fc de IgG comprende un dominio constante CH2 de IgG y uno CH3 de IgG.

"Región estructural" o "FR" se refiere a los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

El término "anticuerpo de longitud completa" indica un anticuerpo que consiste en dos "cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa" y dos "cadenas ligeras de anticuerpo de longitud completa". Una "cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido que consiste, en el sentido de N terminal a C terminal, en un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena pesada 1 (CH1) de anticuerpo, una región bisagra (HR) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena pesada 2 (CH2) de anticuerpo y un dominio constante de la cadena pesada 3 (CH3) de anticuerpo, abreviado como VH-CH1-HR-CH2-CH3; y opcionalmente un dominio constante de la cadena pesada 4 (CH4) de anticuerpo en el caso de un anticuerpo de la subclase IgE. Preferentemente, la "cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" es un

polipéptido que consiste, en sentido de N terminal a C terminal, en VH, CH1, HR, CH2 y CH3. Una "cadena ligera de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido que consiste, en el sentido de N terminal a C terminal, en un dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo, abreviado como VL-CL. El dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo puede ser κ (kappa) o λ (lambda). Las dos cadenas de anticuerpo de longitud completa se unen por medio de enlaces disulfuro entre polipéptidos entre el dominio CL y el dominio CH1 y entre las regiones bisagra de las cadenas pesadas de anticuerpos de longitud completa. Ejemplos de anticuerpos de longitud completa típicos son anticuerpos naturales como IgG (por ejemplo, IgG 1 e IgG2), IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos de longitud completa de acuerdo con la presente divulgación pueden ser de una única especie, por ejemplo, humana, o pueden ser anticuerpos quimerizados o humanizados. En algunos modos de realización, los anticuerpos de longitud completa usados de acuerdo con la presente divulgación, es decir, un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, comprenden dos sitios de unión a antígeno, cada uno formado por un par de VH y VL, que se unen ambos específicamente al mismo antígeno. En otros modos de realización, los anticuerpos de longitud completa usados de acuerdo con la presente divulgación comprenden dos sitios de unión a antígeno, cada uno formado por un par de VH y VL, en los que los dos sitios de unión a antígeno se unen a diferentes antígenos, por ejemplo, en los que los anticuerpos son biespecíficos. El extremo C de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo de longitud completa indica el último aminoácido en el extremo C de dicha cadena pesada o ligera.

Por "fusionado" se quiere decir que los componentes (por ejemplo, un Fab y un dominio transmembranario) se enlazan por enlaces peptídicos, directamente o bien por medio de uno o más conectores peptídicos.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada principal y la descendencia derivada de la misma, independientemente del número de pasos. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar un anticuerpo usado de acuerdo con la presente divulgación. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo unas pocas, pero también células comprendidas en un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden, en general, residuos aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), siendo las últimas las de la mayor variabilidad de secuencia y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden, en general, los residuos aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR), y estos términos se usan en el presente documento de manera intercambiable en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular se ha descrito por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen la superposición o subconjuntos de residuos aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo y/o un receptor de unión a antígeno o variantes de los mismos esté dentro del alcance del término como se define y usa en el presente documento. Los residuos aminoácidos apropiados que engloban las CDR, como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la tabla 1 como comparación. Los números de residuos exactos que engloba una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
CDR1 de V _H	31-35	26-32	26-35
CDR2 de V _H	50-65	52-58	50-58
CDR3 de V _H	95-102	95-102	95-102
CDR1 de V _L	24-34	26-32	24-34
CDR2 de V _L	50-56	50-52	50-56
CDR3 de V _L	89-97	91-96	89-97

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla 1 está de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.* (véase a continuación).

² "AbM" con una "b" minúscula, como se usa en la tabla 1, se refiere a las CDR como se define por el programa informático de modelado de anticuerpos "AbM" de Oxford Molecular.

Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para las secuencias de la región variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de la región variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique de otro modo, las referencias a la numeración de posiciones de residuos aminoacídicos específicas en una región variable de un resto de unión a antígeno son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Las secuencias polipeptídicas del listado de secuencias no se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, está bien dentro de la habilidad del experto en la técnica convertir la numeración de las secuencias del listado de secuencias a la numeración de Kabat.

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

Por molécula de ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su entorno natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la presente divulgación. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterógenas o polinucleótidos (parcial o sustancialmente) purificados en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula polinucleotídica contenida en células que contienen normalmente la molécula polinucleotídica, pero la molécula polinucleotídica está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente divulgación, así como formas de hebras positivas y negativas y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente divulgación incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, sitio de unión a ribosoma o un finalizador de la transcripción.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente divulgación, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto en que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se puede delecionar o sustituir con otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta un 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Como cuestión práctica, se puede determinar convencionalmente si cualquier secuencia polinucleotídica particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente divulgación usando programas informáticos conocidos, tales como los analizados a continuación para polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

Por polipéptido "aislado" o variante o derivado del mismo se pretende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel de purificación particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado se puede retirar de su entorno natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células

huésped se consideran aislados para los propósitos de la presente divulgación, ya que son polipéptidos naturales o recombinantes que se han separado, fraccionado o parcial o sustancialmente purificado mediante cualquier técnica adecuada.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían. En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos aminoácidos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se apreciará que, si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "molécula de ácido nucleico" se refiere a la secuencia de bases que comprende bases purínicas y pirimidínicas que componen los polinucleótidos, con lo que dichas bases representan la estructura primaria de una molécula de ácido nucleico. En el presente documento, el término "molécula de ácido nucleico" incluye ADN, ADNc, ADN genómico, ARN, formas sintéticas de ADN y polímeros mixtos que comprenden dos o más de estas moléculas. Además, el término "molécula de ácido nucleico" incluye tanto hebras de sentido como de antisentido. Además, la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede contener bases nucleotídicas no naturales o derivatizadas, como lo apreciarán fácilmente los expertos en la técnica.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Una composición farmacéutica comprende normalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

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

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) enlazados linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, proteína, cadena de aminoácidos o cualquier otro término usado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos se incluyen

dentro de la definición de polipéptido, y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de, o de manera intercambiable con, cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluyendo, sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido se puede derivar de una fuente biológica natural o producir por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluyendo por síntesis química. Un polipéptido de la presente divulgación puede ser de un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1000 o más, o 2000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tienen necesariamente dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, se denominan desplegados.

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN derivado de virus o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos peptid nucleicos (APN)). El término "molécula de ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

"Unión reducida", por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc, se refiere a una disminución en la afinidad para la interacción respectiva, como se mide, por ejemplo, por RPS. Por claridad, el término incluye también la reducción de la afinidad hasta cero (o por debajo del límite de detección del procedimiento analítico), es decir, la supresión completa de la interacción. Por el contrario, "unión incrementada" se refiere a un incremento en la afinidad de unión para la interacción respectiva.

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

Como se usa en el presente documento, el término "monocatenario" se refiere a una molécula que comprende monómeros aminoacídicos enlazados linealmente por enlaces peptídicos. En determinados modos de realización, uno de los restos de unión a antígeno es un fragmento scFv, es decir, un dominio VH y un dominio VL conectados por un conector peptídico. En determinados modos de realización, uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab monocatenaria, es decir, una molécula Fab en la que la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se conectan por un conector peptídico para formar una única cadena peptídica. En un modo de realización particular de este tipo, el extremo C de la cadena ligera de Fab se conecta al extremo N de la cadena pesada de Fab en la molécula Fab monocatenaria.

El término "SSD", como se usa en el presente documento, se refiere al dominio de señalización estimulante.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural de una enfermedad en el individuo que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante el transcurso de análisis clínicos. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, evitar la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar la metástasis, disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del grado de actividad de la enfermedad y remisión o pronóstico mejorado. En algunos modos de realización, los receptores de unión a antígeno que expresan células de la presente divulgación se usan conjuntamente con anticuerpos terapéuticos que comprenden un dominio Fc mutado para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "determinante antigénico diana" es sinónimo de "antígeno diana", "epítipo diana" y «antígeno de células diana» y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional constituida por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un anticuerpo, formando un complejo resto de unión a antígeno-antígeno. Los determinantes antigénicos útiles se pueden encontrar, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células patológicas, sobre la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (MEC). Las proteínas denominadas antígenos en el presente documento (por ejemplo, CD20, CEA, FAP, TNC) pueden ser cualquier forma natural de las proteínas de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como

primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. En un modo de realización particular, el antígeno diana es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína diana específica en el presente documento, el término engloba la proteína diana no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de la proteína diana que resulte del procesamiento en la célula diana.

El término también engloba variantes naturales de la proteína diana, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Las proteínas diana humanas ejemplares útiles como antígenos incluyen, pero no se limitan a: CD20, CEA, FAP, TNC, MSLN, FolR1, HER1 y HER2. La capacidad de un anticuerpo para unirse a un determinante antigénico diana específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (RPS) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En un modo de realización, el grado de unión del anticuerpo a una proteína no relacionada es menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo al antígeno diana medida, por ejemplo, por RPS. En determinados modos de realización, el anticuerpo se une al antígeno diana con una constante de disociación de afinidad (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

Los "anticuerpos que comprenden un dominio Fc mutado" de acuerdo con la presente divulgación, es decir, anticuerpos terapéuticos, pueden tener uno, dos, tres o más dominios de unión y pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o multispecíficos. Los anticuerpos pueden ser de longitud completa de una única especie, o ser quimerizados o humanizados. Para un anticuerpo con más de dos dominios de unión a antígeno, algunos dominios de unión pueden ser idénticos y/o tener la misma especificidad.

"Activación de linfocitos T", como se usa en el presente documento, se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, seleccionadas de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. Los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación pueden inducir la activación de linfocitos T. Los ensayos adecuados para medir la activación de linfocitos T son conocidos en la técnica descrita en el presente documento.

De acuerdo con la presente divulgación, el término "receptor de linfocitos T" o "TCR" es comúnmente conocido en la técnica. En particular, en el presente documento, el término "receptor de linfocitos T" se refiere a cualquier receptor de linfocitos T, siempre que se cumplan los tres criterios siguientes: (i) especificidad tumoral, (ii) reconocimiento de (la mayoría de) las células tumorales, lo que significa que un antígeno o diana se debe expresar en (la mayoría de) las células tumorales y (iii) que el TCR coincida con el tipo de HLA del sujeto al que se va a tratar. En este contexto, los receptores de linfocitos T adecuados que cumplen los tres criterios mencionados anteriormente son conocidos en la técnica, tales como receptores que reconocen NY-ESO-1 (para obtener información sobre las secuencias, véase, por ejemplo, la publicación PCT/GB2005/001924, publicada como el documento WO 2005/113595 A2) y/o HER2neu (para obtener información sobre las secuencias, véase el documento WO-A1 2011/0280894).

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

El término "vector" o "vector de expresión" es sinónimo de "construcción de expresión" y se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se asocia de forma funcional en una célula diana. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. El vector de expresión de la presente divulgación comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está en el interior de la célula diana, la molécula de ácido ribonucleico o proteína que se codifica por el gen se produce por el mecanismo de transcripción y/o traducción celular. En un modo de realización, el vector de expresión de la presente divulgación comprende un casete de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican receptores de unión a antígeno de la presente divulgación o fragmentos de los mismos.

Receptores de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a (un) dominio(s) Fc mutado(s)

La presente divulgación proporciona receptores de unión a antígeno que se pueden unir específicamente al dominio Fc mutado de un anticuerpo, es decir, un anticuerpo terapéutico dirigido a una célula cancerosa. En particular, la presente divulgación proporciona receptores de unión a antígeno que comprenden un dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc no mutado original. En modos de realización preferentes, el dominio Fc mutado comprende al menos una sustitución aminoacídica en comparación con el dominio Fc original no mutado, en el que la unión al receptor de Fc por el dominio Fc mutado se reduce en comparación con la unión al receptor de Fc por el dominio Fc no mutado. En modos de realización particulares, la

presente divulgación proporciona receptores de unión a antígeno que comprenden un dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado, en el que el al menos un resto de unión a antígeno no se puede unir específicamente al dominio Fc no mutado original, en el que el dominio Fc mutado comprende al menos una sustitución aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en L234, L235, I253, H310, P331, P329 y H435, en particular en el que la mutación aminoacídica es L234A, L235A, I253A, N297A, H310A, P329G y/o H435A, en comparación con el dominio Fc original no mutado, en el que la unión al receptor de Fc por el dominio Fc mutado se reduce en comparación con la unión al receptor de Fc por el dominio Fc no mutado. En un modo de realización preferente, la mutación aminoacídica es P329G, en la que la unión al receptor de Fc γ se reduce, como se mide por RPS a 25 °C. En otro modo de realización preferente, las mutaciones aminoacídicas son I253A, H310A y H435A, en el que la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn) se reduce, como se mide por RPS a 25 °C.

La presente divulgación se refiere además a la transducción de linfocitos T, tales como linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD3+, linfocitos T $\gamma\delta$ o linfocitos T citolíticos naturales (NK), preferentemente linfocitos T CD8+, con un receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento y su reclutamiento dirigido, por ejemplo, a un tumor, por una molécula de anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo terapéutico, que comprende un dominio Fc mutado. En un modo de realización, el anticuerpo se puede unir específicamente a un antígeno específico de tumor que se encuentra de forma natural sobre la superficie de una célula tumoral.

Como se muestra en los ejemplos adjuntos, como prueba del concepto según la invención, se construyó el receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular de acuerdo con la presente divulgación pETR17096 (SEQ ID NO: 7, codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 19) que se puede unir específicamente a un anticuerpo terapéutico (representado por el anticuerpo anti-CD20 que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 112 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 113) que comprende la mutación P329G. Los linfocitos T transducidos (linfocitos T Jurkat NFAT) que expresan la proteína anti-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO: 7, codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 19) se podrían activar fuertemente por coincubación con el anticuerpo anti-CD20 que comprende la mutación P329G en el dominio Fc conjuntamente con células tumorales que expresan CD20. Los autores de la invención proporcionaron además múltiples formatos del receptor de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado para respaldar la prueba del concepto según la invención.

El tratamiento de células tumorales mediante la combinación de un anticuerpo dirigido contra un antígeno tumoral, en el que el anticuerpo comprende la mutación P329G conjuntamente con linfocitos T transducidos que expresan la proteína anti-P329G-Fab-ds-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO: 44 (ADN) y 39, 41 (proteína)) da lugar a sorprendentemente a una activación más fuerte del linfocito T transducido en comparación con los linfocitos T transducidos que expresan la proteína de fusión anti-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO: 19 (ADN) y 7 (proteína)). (véanse, por ejemplo, las figuras 6 y 8 a 11).

En consecuencia, se descubrió de manera sorprendente e inesperada que los linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+, que se transdujeron con un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación se pueden estimular específicamente mediante el uso de un anticuerpo específico de tumor que comprende un dominio Fc mutado y reclutado por el anticuerpo específico de tumor como elemento de enlace a la célula tumoral. Por tanto, se demostró de manera sorprendente e inesperada en la presente divulgación que el emparejamiento de un anticuerpo específico de tumor, es decir, un anticuerpo terapéutico, que comprende un dominio Fc mutado con linfocitos T transducidos con un receptor de unión a antígeno que comprende/consiste en un dominio extracelular que comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente al dominio Fc mutado, daría como resultado una activación específica de los linfocitos T y la lisis posterior de la célula tumoral. Este enfoque conlleva importantes ventajas de seguridad sobre los enfoques convencionales basados en linfocitos T, ya que el linfocito T sería inerte en ausencia del anticuerpo que comprende el dominio Fc mutado y se puede controlar su disponibilidad mediante el formato de la molécula de anticuerpo elegido (es decir, moléculas más pequeñas para una semivida más corta y viceversa). En consecuencia, la presente divulgación proporciona una plataforma terapéutica versátil en la que se pueden usar anticuerpos de tipo IgG para marcar o etiquetar células tumorales como una guía para el linfocito T y en la que los linfocitos T transducidos se dirigen específicamente hacia las células tumorales al proporcionar especificidad por un dominio Fc mutado del anticuerpo de tipo IgG. Después de unirse al dominio Fc mutado del anticuerpo sobre la superficie de una célula tumoral, el linfocito T transducido como se describe en el presente documento se activa y, posteriormente, la célula tumoral se lisará. La plataforma es flexible y específica, permitiendo el uso de diversos anticuerpos diana (existentes o recientemente desarrollados) o la coaplicación de múltiples anticuerpos con diferente especificidad por el antígeno pero que comprenden la misma mutación en el dominio Fc. El grado de activación de los linfocitos T se puede ajustar además ajustando la dosis del anticuerpo terapéutico coaplicado o cambiando a diferentes especificidades o formatos de anticuerpo. Los linfocitos T transducidos de acuerdo con la presente divulgación son inertes sin la coaplicación de un anticuerpo al que dirigirse que comprenda un dominio Fc mutado porque las mutaciones en el dominio Fc como se describen en el presente documento no se producen en inmunoglobulinas naturales o no mutadas. En consecuencia, en un modo de realización, el dominio Fc mutado no se encuentra de forma natural en las inmunoglobulinas naturales.

En consecuencia, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado, en el que el al menos un resto de unión a antígeno no se puede unir específicamente al dominio Fc no mutado original, en el que el dominio Fc mutado comprende al menos una mutación aminoacídica en comparación con el dominio Fc original no mutado, en el que la unión al receptor de Fc por el dominio Fc mutado y/o la función efectora inducida por el dominio Fc mutado se reducen en comparación con la unión al receptor de Fc y/o la función efectora inducidas por el dominio Fc no mutado. Puede ser en particular deseable usar anticuerpos terapéuticos con función efectora reducida en el tratamiento del cáncer, ya que la función efectora puede dar lugar a efectos secundarios graves de los tratamientos tumorales basados en anticuerpos, como se describe además en el presente documento. En el contexto de la presente divulgación, el receptor de unión a antígeno comprende un dominio extracelular que no se encuentra de forma natural en o sobre los linfocitos T. Por tanto, el receptor de unión a antígeno puede proporcionar una especificidad de unión personalizada por las células que expresan el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación. Las células, por ejemplo, linfocitos T, transducidas con (un) receptor(es) de unión a antígeno de la presente divulgación se vuelven capaces de unirse específicamente a un dominio Fc mutado pero no al dominio Fc original no mutado. La especificidad se proporciona por el resto de unión a antígeno del dominio extracelular del receptor de unión a antígeno, considerándose dichos restos de unión a antígeno específicos para el dominio Fc mutado como se define en el presente documento. En el contexto de la presente divulgación, y como se expone en el presente documento, el resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado se une a / interactúa con el dominio Fc mutado pero no a/con el dominio Fc original no mutado.

Restos de unión a antígeno

En un modo de realización ilustrativo de la presente divulgación, como prueba de concepto, se proporcionan receptores de unión a antígeno que comprenden un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno, en el que el al menos un resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el dominio Fc mutado comprende al menos una sustitución aminoacídica en comparación con el Fc original no mutado.

En un determinado modo de realización, al menos uno de los restos de unión a antígeno es un fragmento Fab convencional, es decir, una molécula Fab que consiste en una cadena ligera de Fab y una cadena pesada de Fab. En un determinado modo de realización, al menos uno de los restos de unión a antígeno es un fragmento crossFab, es decir, una molécula Fab que consiste en una cadena ligera de Fab y una cadena pesada de Fab, en el que se intercambian las regiones variables o bien las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de Fab. En determinados modos de realización, al menos uno de los restos de unión a antígeno es un fragmento scFv. En un modo de realización particular de este tipo, el extremo C de la cadena pesada variable (VH) se conecta al extremo N de la cadena ligera variable (VL) en la molécula scFv, opcionalmente a través de un conector peptídico. En determinados modos de realización, al menos uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab monocatenaria, es decir, una molécula Fab en la que la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se conectan por un conector peptídico para formar una única cadena peptídica. En un modo de realización particular de este tipo, el extremo C de la cadena ligera de Fab se conecta al extremo N de la cadena pesada de Fab en la molécula Fab monocatenaria, opcionalmente a través de un conector peptídico.

En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, el resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el dominio Fc mutado comprende al menos una sustitución aminoacídica en comparación con el dominio Fc original no mutado.

Los restos de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a un dominio Fc mutado se pueden generar mediante inmunización de, por ejemplo, el sistema inmunitario de un mamífero. Dichos procedimientos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Burns en *Methods in Molecular Biology* 295:1-12 (2005). De forma alternativa, los restos de unión a antígeno de la presente divulgación se pueden aislar cribando colecciones combinatorias para detectar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Los procedimientos para cribar colecciones combinatorias se revisan, por ejemplo, en Lerner *et al.* en *Nature Reviews* 16:498-508 (2016). Por ejemplo, son conocidos en la técnica una variedad de procedimientos para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para detectar restos de unión a antígeno que posean las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Frenzel *et al.* en *mAbs* 8:1177-1194 (2016); Bazan *et al.* en *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8:1817-1828 (2012) y Zhao *et al.* en *Critical Reviews in Biotechnology* 36:276-289 (2016), así como en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992) y en Marks y Bradbury en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-

2): 119-132 (2004). En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que a continuación se pueden cribar para detectar fagos de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.* en Annual Review of Immunology 12: 433-455 (1994). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan restos de unión a antígeno de alta afinidad por el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio indiferenciado (por ejemplo, de un ser humano) para proporcionar una única fuente de restos de unión a antígeno para una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización, como se describe por Griffiths *et al.* en EMBO Journal 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar colecciones indiferenciadas sintéticamente clonando segmentos del gen V no reordenados de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro*, como se describe en Hoogenboom y Winter en Journal of Molecular Biology 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos con anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: las patentes de EE. UU. n.º 5.750.373; 7.985.840; 7.785.903 y 8.679.490, así como las publicaciones de patentes de EE. UU. n.º 2005/0079574, 2007/0117126, 2007/0237764 y 2007/0292936 y 2009/0002360. Otros ejemplos de procedimientos conocidos en la técnica para cribar colecciones combinatorias para detectar anticuerpos con una actividad o actividades deseadas incluyen presentación en ribosomas y ARNm, así como procedimientos para presentación y selección de anticuerpos en bacterias, células de mamífero, células de insecto o células de levadura. Se revisan los procedimientos para presentación en la superficie de levaduras, por ejemplo, en Scholler *et al.* en Methods in Molecular Biology 503:135-56 (2012) y en Cherf *et al.* en Methods in Molecular Biology 1319:155-175 (2015), así como en Zhao *et al.* en Methods in Molecular Biology 889:73-84 (2012). Se describen los procedimientos para la presentación en ribosomas, por ejemplo, en He *et al.* en Nucleic Acids Research 25:5132-5134 (1997) y en Hanes *et al.* en PNAS 94:4937-4942 (1997).

En el contexto de la presente divulgación, en el presente documento se proporcionan receptores de unión a antígeno que comprenden al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado. En consecuencia, las células transducidas, es decir, linfocitos T, que expresan un receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación se pueden unir específicamente al dominio Fc mutado de un anticuerpo, es decir, de un anticuerpo terapéutico. Un dominio Fc confiere a los anticuerpos, es decir, anticuerpos terapéuticos, propiedades farmacocinéticas favorables, incluyendo una semivida en suero larga, lo que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una proporción de distribución tejido-sangre favorable. Al mismo tiempo, sin embargo, puede dar lugar a que los anticuerpos terapéuticos seleccionen como diana de forma indeseable células que expresan receptores de Fc en lugar de las células portadoras de antígenos preferentes. Además, la coactivación de las vías de señalización de receptores de Fc puede dar lugar a la liberación de citocinas, lo que da como resultado una activación excesiva de los receptores de citocinas y efectos secundarios graves tras la administración sistémica de anticuerpos terapéuticos. La activación de células inmunitarias (portadoras de receptores de Fc) distintas de los linfocitos T puede incluso reducir la eficacia de los anticuerpos terapéuticos debido a la potencial destrucción de las células inmunitarias. En consecuencia, se pueden genomanipular o mutar anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica para que presenten afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con, por ejemplo, un dominio Fc de IgG₁ natural. Los receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación se pueden usar para dirigir células efectoras, por ejemplo, linfocitos T, que expresan los receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación *in vitro* y/o *in vivo* a células diana, es decir, células tumorales, que se marcan con un anticuerpo que se puede unir específicamente a las células diana, en los que el anticuerpo comprende un dominio Fc genomanipulado y/o mutado como se describe en el presente documento.

En un modo de realización ilustrativo de la presente divulgación, como prueba de concepto, se proporcionan receptores de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación de aminoácida P329G y células efectoras que expresan dichos receptores de unión a antígeno. La mutación P329G reduce la unión a los receptores de Fcγ y la función efectora asociada. En consecuencia, el dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G se une a los receptores de Fcγ con una afinidad reducida o suprimida en comparación con el dominio Fc no mutado. En un modo de realización ilustrativo alternativo de la presente divulgación, como prueba de concepto, se proporcionan receptores de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones aminoácidas I253A, H310A y H435A ("AAA"). Las mutaciones AAA suprimen esencialmente la unión al FcRn.

Sin embargo, los anticuerpos con reducida, con mejorada o disminuida unión a receptores de Fc (FcR) y/o función efectora que comprenden un dominio Fc mutado se usan ampliamente en la técnica. En consecuencia, en el presente documento se proporcionan receptores de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a anticuerpos que comprenden un dominio Fc mutado; dichos anticuerpos también se denominan en el presente documento anticuerpos diana. En consecuencia, en un modo de realización, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación se puede unir específicamente a un anticuerpo diana que comprende un dominio Fc mutado con afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida. Los anticuerpos diana con una función efectora reducida incluyen aquellos con mutación en uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con

mutaciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con mutación en los residuos 265 y 297 a alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581). Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión a FcR mejorada o disminuida. (Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)).

En determinados modos de realización, se proporciona un receptor de unión a antígeno que se puede unir específicamente a una variante de anticuerpo que comprende una región Fc con una o más mutaciones aminoacídicas que mejoran la ADCC, por ejemplo, mutaciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos). En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo diana comprende una región Fc con una o más mutaciones aminoacídicas que reducen o disminuyen la unión a FcRn, por ejemplo, mutaciones en las posiciones 253 y/o 310 y/o 435 de la región Fc (numeración EU de los residuos). En determinados modos de realización, la variante de anticuerpo diana comprende una región Fc con las mutaciones aminoacídicas en las posiciones 253, 310 y 435. En un modo de realización, las mutaciones son I253A, H310A y H435A en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. Véase, por ejemplo, Grevys, A. *et al.*, J. Immunol. 194 (2015) 5497-5508.

En determinados modos de realización, se proporciona un receptor de unión a antígeno que se puede unir específicamente a una variante de anticuerpo que comprende una región Fc con una o más mutaciones aminoacídicas, con unión a FcRn reducida o disminuida, por ejemplo, mutaciones en una de las posiciones 310 y/o 433 y/o 436 de la región Fc (numeración EU de los residuos). En determinados modos de realización, la variante de anticuerpo diana comprende una región Fc con las mutaciones aminoacídicas en las posiciones 310, 433 y 436. En un modo de realización, las mutaciones son H310A, H433A y Y436A en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo diana comprende una región Fc con una o más mutaciones aminoacídicas que incrementan la unión a FcRn, por ejemplo, mutaciones en las posiciones 252 y/o 254 y/o 256 de la región Fc (numeración EU de los residuos). En determinados modos de realización, la variante de anticuerpo diana comprende una región Fc con las mutaciones aminoacídicas en las posiciones 252, 254 y 256. En un modo de realización, las mutaciones son M252Y, S254T y T256E en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. En determinados modos de realización, se proporciona un receptor de unión a antígeno que se puede unir específicamente a una variante de anticuerpo que comprende una región Fc con mutaciones aminoacídicas que disminuyen la unión a FcγR, por ejemplo, mutaciones en las posiciones 234, 235 y 329 de la región Fc (numeración EU de los residuos). En un modo de realización, las mutaciones son L234A y L235A (LALA). En determinados modos de realización, la variante de anticuerpo diana comprende además D265A y/o P329G en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. En un modo de realización, la mutación es P329G ("PG") en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana. En otro modo de realización, las mutaciones son I253A, H310A y H435A ("AAA") en una región Fc derivada de una región Fc de IgG1 humana.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable. En un modo de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG, específicamente uno de IgG₁ o IgG₄. En un modo de realización, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En un modo de realización, el dominio Fc mutado presenta afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una o más mutaciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora.

En un modo de realización preferente, las una o más mutaciones aminoacídicas están en una o más posiciones seleccionadas del grupo de L234, L235 y P329 (numeración de Kabat). En un modo de realización particular, cada subunidad del dominio Fc comprende tres mutaciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc activador y/o la función efectora, en la que dichas mutaciones aminoacídicas son L234A, L235A y P329G. En un modo de realización particular, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ. En un modo de realización, la función efectora es citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

En un modo de realización particular, el dominio Fc mutado comprende la mutación P329G. En consecuencia, el dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G se une a los receptores de Fcγ con una afinidad reducida o suprimida en comparación con el dominio Fc no mutado. En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende al menos uno de:

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

(b) una secuencia de aminoácidos de CDR H2 de EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 2); y

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

En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión

a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera que comprende al menos uno de:

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

En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y las CDR de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

En un modo de realización preferente, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR H) 1 de RYWMN (SEQ ID NO: 1);
- (b) una secuencia de aminoácidos de CDR H2 de EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 2);
- (c) una secuencia de aminoácidos de CDR H3 de PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3); y una región variable de la cadena ligera que comprende:
- (d) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (CDR L) 1 de RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4);
- (e) una secuencia de aminoácidos de CDR L2 de GTNKRAP (SEQ ID NO: 5); y
- (f) una secuencia de aminoácidos de CDR L3 de ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 32 y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 33.

En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 32 y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 33.

En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

En un modo de realización preferente, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno es un fragmento scFv, uno Fab, uno crossFab o uno scFab. En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab.

En un modo de realización preferente, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el fragmento Fab comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 40 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 41.

En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el al menos un resto de unión a antígeno es un fragmento scFv que es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH), un dominio variable de la cadena ligera (VL) y un conector, en el que dichos dominios variables y dicho conector tienen una de las siguientes configuraciones en sentido de N terminal a C terminal: a) VH-conector-VL o b) VL-conector-VH. En un modo de realización preferente, el fragmento scFv tiene la configuración VH-conector-VL.

En un modo de realización preferente, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el fragmento scFv comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En un modo de realización alternativo particular, el dominio Fc mutado comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A ("AAA"). Las mutaciones AAA reducen la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn). En consecuencia, el dominio Fc mutado que comprende las mutaciones AAA se une al FcRn con una afinidad reducida o suprimida en comparación con el dominio Fc no mutado.

En consecuencia, en un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende al menos uno de:

(a) una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR H) 1 de SYGMS (SEQ ID NO: 53);

(b) una secuencia de aminoácidos de CDR H2 de SSGGSY (SEQ ID NO: 54); y

(c) una secuencia de aminoácidos de CDR H3 de LGMITTGYAMDY (SEQ ID NO: 55).

En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera que comprende al menos uno de:

(d) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (CDR L) 1 de RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO: 56);

(e) una secuencia de aminoácidos de CDR L2 de KVSNRFS (SEQ ID NO: 57); y

(f) una secuencia de aminoácidos de CDR L3 de FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 58).

En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el resto de unión a antígeno comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58.

En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55 y las CDR de la cadena ligera de SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58.

En un modo de realización preferente, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto

de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende:

- 5 (a) una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR H) 1 de SYGMS (SEQ ID NO: 53);
- (b) una secuencia de aminoácidos de CDR H2 de SSGGSY (SEQ ID NO: 54);
- 10 (c) una secuencia de aminoácidos de CDR H3 de LGMITGYAMDY (SEQ ID NO: 55); y una región variable de la cadena ligera que comprende:
- (d) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (CDR L) 1 de RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO: 56);
- 15 (e) una secuencia de aminoácidos de CDR L2 de KVSNRFS (SEQ ID NO: 57); y
- (f) una secuencia de aminoácidos de CDR L3 de FQGSHPVPT (SEQ ID NO: 58).

20 En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 62.

25 En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62.

30 En un modo de realización, el al menos un resto de unión a antígeno es un fragmento scFv, uno Fab, uno crossFab o uno scFab. En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el al menos el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab. En un modo de realización particular, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el fragmento Fab comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 64 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 65.

35 En un modo de realización, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el al menos un resto de unión a antígeno es un fragmento scFv. En un modo de realización particular, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el fragmento scFv comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

40 En otros modos de realización de acuerdo con la presente divulgación, el resto de unión a antígeno comprendido en el dominio extracelular es un fragmento Fab monocaténario o scFab.

45 Los fragmentos Fab y scFab se estabilizan por medio del enlace disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1. Los restos de unión a antígeno que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena ligera (VL), tales como los fragmentos Fab, crossFab, scFv y scFab como se describen en el presente documento, se podrían estabilizar además introduciendo puentes disulfuro intercaténarios entre el dominio VH y el VL. En consecuencia, en un modo de realización, el(los) fragmento(s) Fab, el(los) fragmento(s) crossFab, el(los) fragmento(s) scFv y/o el(los) fragmento(s) scFab comprendidos en los receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación se podrían estabilizar además mediante la generación de enlaces disulfuro intercaténarios por medio de inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, la posición 44 en la cadena pesada variable y la posición 100 en la cadena ligera variable de acuerdo con la numeración de Kabat). En los ejemplos y figuras adjuntos se hace referencia a dichos restos de unión a antígeno estabilizados mediante el término "ds".

60 Dominio transmembranario de anclaje

65 En el contexto de la presente divulgación, el dominio transmembranario de anclaje de los receptores de unión a

antígeno de la presente divulgación se puede caracterizar por no tener un sitio de escisión para proteasas de mamíferos. En el contexto de la presente divulgación, las proteasas se refieren a enzimas proteolíticas que pueden hidrolizar la secuencia de aminoácidos de un dominio transmembranario que comprende un sitio de escisión para la proteasa. El término "proteasas" incluye tanto endopeptidasas como exopeptidasas. En el contexto de la presente divulgación, se puede usar cualquier dominio transmembranario de anclaje de una proteína transmembranaria como se establece, entre otros, en la nomenclatura CD, para generar los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación, que activan linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+, al unirse a un dominio Fc mutado como se define en el presente documento.

En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, el dominio transmembranario de anclaje puede comprender parte de un dominio transmembranario murino/ratón o, preferentemente, humano. Un ejemplo de dicho dominio transmembranario de anclaje es un dominio transmembranario de CD28, por ejemplo, que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en el presente documento en SEQ ID NO: 11 (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 24). En el contexto de la presente divulgación, el dominio transmembranario del receptor de unión a antígeno de la presente divulgación puede comprender/consistir en una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 11 (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 24).

En un modo de realización ilustrativo de la presente divulgación, como prueba de concepto, se proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un resto de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 22), y un fragmento/parte polipeptídica de CD28 (el número de entrada de UniProt del CD28 humano es P10747 (con el número de versión 173 y la versión 1 de la secuencia)) como se muestra en el presente documento como SEQ ID NO: 71 (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 70). De forma alternativa, se puede usar cualquier proteína que tenga un dominio transmembranario, como se proporciona, entre otros, en la nomenclatura CD, como un dominio transmembranario de anclaje de la proteína receptora de unión a antígeno de la presente divulgación. Como se describe anteriormente, el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento puede comprender el dominio transmembranario de anclaje de CD28 que se localiza en los aminoácidos 153 a 179, 154 a 179, 155 a 179, 156 a 179, 157 a 179, 158 a 179, 159 a 179, 160 a 179, 161 a 179, 162 a 179, 163 a 179, 164 a 179, 165 a 179, 166 a 179, 167 a 179, 168 a 179, 169 a 179, 170 a 179, 171 a 179, 172 a 179, 173 a 179, 174 a 179, 175 a 179, 176 a 179, 177 a 179 o 178 a 179 de la proteína CD28 humana de longitud completa como se muestra en SEQ ID NO: 71 (codificada por el ADNc mostrado en SEQ ID NO: 70). En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, el dominio transmembranario de anclaje puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 11 (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 24).

En un modo de realización, se proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el receptor de unión a antígeno comprende una

(a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 fusionada en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11, opcionalmente a través del conector peptídico de SEQ ID NO: 17; y

(b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65.

En un modo de realización, se proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el receptor de unión a antígeno comprende una

(a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 49 fusionada en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11, opcionalmente a través del conector peptídico de SEQ ID NO: 17; y

(b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 41 u SEQ ID NO: 50.

En un modo de realización, se proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el receptor de unión a antígeno comprende una

(a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 fusionada en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11, opcionalmente a través del conector

peptídico de SEQ ID NO: 17; y

(b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

5 En un modo de realización preferente, se proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G, en el que el receptor de unión a antígeno comprende una

10 (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 fusionada en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11, opcionalmente a través del conector peptídico de SEQ ID NO: 17; y

(b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

15 En un modo de realización, se proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende un fragmento scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el receptor de unión a antígeno comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 60 fusionado en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11, opcionalmente a través del conector peptídico de SEQ ID NO: 17.

20 En un modo de realización, se proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende un fragmento scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el receptor de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 34 fusionada en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11, opcionalmente a través del conector peptídico de SEQ ID NO: 17.

25 En un modo de realización preferente, se proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende un fragmento scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc que comprende la mutación P329G pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el receptor de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 fusionada en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11, opcionalmente a través de un conector peptídico de SEQ ID NO: 17.

30 En un modo de realización preferente, se proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende un fragmento scFv que se puede unir específicamente a un dominio scFab que comprende la mutación P329G pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el fragmento scFv comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 fusionada en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11, opcionalmente a través de un conector peptídico de SEQ ID NO: 17.

45 **Dominio de señalización estimulante (SSD) y dominio de señalización coestimulante (CSD)**

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

60 Por tanto, el dominio de señalización estimulante que está comprendido en el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento puede ser un fragmento/parte polipeptídica de la longitud completa de CD3z, FCGR3A o NKG2D. Las secuencias de aminoácidos de CD3z o NKG2D murino/ratón de longitud completa se muestran en el presente documento como SEQ ID NO: 96 (CD3z), 100 (FCGR3A) o 104 (NKG2D) (murino/ratón, codificadas por las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 97 (CD3z), 101 (FCGR3A) o 105 (NKG2D). Las secuencias de aminoácidos del CD3z, FCGR3A o NKG2D humano de longitud completa se muestran en el presente documento como SEQ ID NO: 94 (CD3z), 98 (FCGR3A) o 102 (NKG2D) (humano, codificada por las

secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 95 (CD3z), 99 (FCGR3A) o 103 (NKG2D)). El receptor de unión a antígeno de la presente divulgación puede comprender fragmentos de CD3z, FCGR3A o NKG2D como dominio estimulante, siempre que comprenda al menos un dominio de señalización. En particular, cualquier parte/fragmento de CD3z, FCGR3A o NKG2D es adecuada como dominio estimulante siempre que comprenda al menos un motivo de señalización. Sin embargo, más preferentemente, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación comprende polipéptidos que se derivan de origen humano. Por tanto, más preferentemente, el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento comprende las secuencias de aminoácidos como se muestra en el presente documento como SEQ ID NO: 94 (CD3z), 98 (FCGR3A) o 102 (NKG2D) (humano, codificada por las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 95 (CD3z), 99 (FCGR3A) o 103 (NKG2D)). Por ejemplo, el fragmento/parte polipeptídica del CD3z humano que puede estar comprendida en el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 26). En consecuencia, en un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 13 o una secuencia que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con SEQ ID NO: 13 y que se caracteriza por tener una actividad de señalización estimulante. A continuación en el presente documento y en los ejemplos y figuras se proporcionan configuraciones específicas de receptores de unión a antígeno que comprenden un dominio de señalización estimulante (SSD). La actividad de señalización estimulante se puede determinar, por ejemplo, mediante liberación de citocinas potenciada, medida por ELISA (IL-2, IFN γ , TNF α), actividad proliferativa potenciada (medida por números de células potenciados) o actividad lítica potenciada medida por ensayos de liberación de LDH.

Además, el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento comprende preferentemente al menos un dominio de señalización coestimulante que proporciona actividad adicional al linfocito T. El receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento puede comprender un dominio de señalización coestimulante que es un fragmento/parte polipeptídica de CD28 (la entrada de UniProt del CD28 humano es P10747 (número de versión 173 con número de secuencia 1); la entrada de UniProt del CD28 murino/ratón es P31041 (número de versión 134 con número de secuencia 2)), CD137 (la entrada de UniProt del CD137 humano es Q07011 (número de versión 145 con número de secuencia 1); la entrada de UniProt del CD137 murino/ratón es P20334 (número de versión 139 con número de secuencia 1)), OX40 (la entrada de UniProt del OX40 humano es P23510 (número de versión 138 con número de secuencia 1); la entrada de UniProt del OX40 murino/ratón es P43488 (número de versión 119 con número de secuencia 1)), ICOS (la entrada de UniProt del ICOS humano es Q9Y6W8 (número de versión 126 con número de secuencia 1)); la entrada de UniProt del ICOS murino/ratón es Q9WV40 (número de acceso citable principal) o Q9JL17 (número de acceso citable secundario) con el número de versión 102 y la versión de secuencia 2)), CD27 (la entrada de UniProt del CD27 humano es P26842 (número de versión 160 con número de secuencia 2); la entrada de UniProt del CD27 murino/ratón es P41272 (número de versión 137 con versión de secuencia 1)), 4-1-BB (la entrada de UniProt del 4-1-BB murino/ratón es P20334 (número de versión 140 con versión de secuencia 1); la entrada de UniProt del 4-1-BB humano es Q07011 (número de versión 146 con versión de secuencia)), DAP10 (la entrada de UniProt del DAP10 humano es Q9UBJ5 (número de versión 25 con número de secuencia 1); la entrada de UniProt del DAP10 murino/ratón es Q9QUJ0 (número de acceso citable principal) o Q9R1E7 (número de acceso citable secundario) con el número de versión 101 y el número de secuencia 1) o DAP12 (la entrada de UniProt del DAP12 humano es O43914 (número de versión 146 y el número de secuencia 1); la entrada de UniProt del DAP12 murino/ratón es O054885 (número de acceso citable principal) o Q9R1E7 (número de acceso citable secundario) con el número de versión 123 y el número de secuencia 1) murino/ratón o humano. En determinados modos de realización de la presente divulgación, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación puede comprender uno o más, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los dominios de señalización coestimulante definidos en el presente documento. En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación puede comprender un fragmento/parte polipeptídica de un CD28 murino/ratón o, preferentemente, humano como primer dominio de señalización coestimulante y el segundo dominio de señalización coestimulante se selecciona del grupo que consiste en el CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 y DAP12 murino/ratón o, preferentemente, humano, o fragmentos de los mismos. Preferentemente, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación comprende un dominio de señalización coestimulante que se deriva de un origen humano. Por tanto, más preferentemente, el(los) dominio(s) de señalización coestimulante que está(n) comprendido(s) en el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación puede(n) comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 12 (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 25).

Por lo tanto, el dominio de señalización coestimulante que puede estar opcionalmente comprendido en el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento es un fragmento/parte polipeptídica de CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 y DAP12 de longitud completa. Las secuencias de aminoácidos de los CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 o DAP12 murino/ratón de longitud completa se muestran en el presente documento como SEQ ID NO: 69 (CD27), 73 (CD28), 77 (CD137), 81 (OX40), 85 (ICOS), 89 (DAP10) o 93 (DAP12) (murino/ratón, codificadas por las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 68 (CD27), 72 (CD28), 76 (CD137), 80 (OX40), 84 (ICOS), 88 (DAP10) o 92 (DAP12)). Sin embargo, debido a que las secuencias humanas son las más preferentes en el contexto de la presente divulgación, el dominio de señalización coestimulante que puede estar opcionalmente comprendido en la proteína receptora de unión a antígeno proporcionada en el presente

documento es un fragmento/parte polipeptídica del CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 o DAP12 humano de longitud completa. Las secuencias de aminoácidos de los CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 o DAP12 humano de longitud completa se muestran en el presente documento como SEQ ID NO: 67 (CD27), 71 (CD28), 75 (CD137), 79 (OX40), 83 (ICOS), 87 (DAP10) o 91 (DAP12) (humano, codificadas por las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 66 (CD27), 70 (CD28), 74 (CD137), 78 (OX40), 82 (ICOS), 86 (DAP10) o 90 (DAP12)).

En un modo de realización preferente, el receptor de unión a antígeno comprende CD28 o un fragmento del mismo como dominio de señalización coestimulante. El receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento puede comprender un fragmento de CD28 como dominio de señalización coestimulante, siempre que comprenda al menos un dominio de señalización de CD28. En particular, cualquier parte/fragmento de CD28 es adecuada para el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación siempre que comprenda al menos uno de los motivos de señalización de CD28. Por ejemplo, el polipéptido de CD28 que está comprendido en la proteína receptora de unión a antígeno de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 25). En la presente divulgación, el dominio intracelular de CD28, que funciona como un dominio de señalización coestimulante, puede comprender una secuencia derivada del dominio intracelular del polipéptido de CD28 que tiene la(s) secuencia(s) **YMN**M (SEQ ID NO: 106) y/o **PYAP** (SEQ ID NO: 107). Preferentemente, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación comprende polipéptidos que se derivan de origen humano. Por ejemplo, el fragmento/parte polipeptídica del CD28 humano que puede estar comprendida en el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 25). En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, el receptor de unión a antígeno comprende la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 12 o una secuencia que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con SEQ ID NO: 12 y que se caracteriza por tener una actividad de señalización coestimulante. A continuación en el presente documento y en los ejemplos y figuras se proporcionan configuraciones específicas de receptores de unión a antígeno que comprenden un dominio de señalización coestimulante (CSD). La actividad de señalización coestimulante se puede determinar, por ejemplo, por liberación de citocinas potenciada, medida por ELISA (IL-2, IFN γ , TNF α), actividad proliferativa potenciada (medida por números de células potenciados) o actividad lítica potenciada medida por ensayos de liberación de LDH.

Como se menciona anteriormente, en un modo de realización de la presente divulgación, el dominio de señalización coestimulante del receptor de unión a antígeno se puede derivar del gen CD28 humano (n.º de entrada de UniProt: P10747 (número de acceso con la versión de entrada 173 y la versión 1 de la secuencia)) y proporciona actividad CD28, definida como producción de citocinas, proliferación y actividad lítica de la célula transducida descrita en el presente documento, como un linfocito T transducido. La actividad CD28 se puede medir mediante liberación de citocinas por ELISA o citometría de flujo de citocinas tales como interferón-gamma (IFN- γ) o interleucina 2 (IL-2), proliferación de linfocitos T medida, por ejemplo, por medición de ki67, cuantificación celular por citometría de flujo o actividad lítica evaluada por medición de impedancia en tiempo real de la célula diana (usando, por ejemplo, un instrumento ICELLigence como se describe, por ejemplo, en Thakur *et al.*, Biosens Bioelectron. 35(1) (2012), 503-506; Krutzik *et al.*, Methods Mol Biol. 699 (2011), 179-202; Ekkens *et al.*, Infect Immun. 75(5) (2007), 2291-2296; Ge *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 99(5) (2002), 2983-2988; Duwell *et al.*, Cell Death Differ. 21(12) (2014), 1825-1837, Errata en: Cell Death Differ. 21(12) (2014), 161). Los dominios de señalización coestimulante **PYAP** (aa 208 a 211 de SEQ ID NO: 107 y **YMN**M (aa 191 a 194 de SEQ ID NO: 106) son beneficiosos para la función del polipéptido CD28 y los efectos funcionales enumerados anteriormente. La secuencia de aminoácidos del dominio **YMN**M se muestra en SEQ ID NO: 106 y la secuencia de aminoácidos del dominio **PYAP** se muestra en SEQ ID NO: 107. En consecuencia, en el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación, el polipéptido CD28 comprende preferentemente una secuencia derivada del dominio intracelular de un polipéptido CD28 que tiene las secuencias **YMN**M (SEQ ID NO: 106) y/o **PYAP** (SEQ ID NO: 107). En el contexto de la presente divulgación, un dominio intracelular de un polipéptido CD28 que tiene las secuencias **YMN**M (SEQ ID NO: 106) y/o **PYAP** (SEQ ID NO: 107) se caracteriza por una actividad CD28, definida como producción de citocinas, proliferación y actividad lítica de una célula transducida descrita en el presente documento como, por ejemplo, un linfocito T transducido. En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, el dominio de señalización coestimulante de los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 (humana) (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 25). Sin embargo, en el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación, uno o ambos de estos dominios pueden estar mutados a **FMN**M (SEQ ID NO: 108) y/o **AYAA** (SEQ ID NO: 109), respectivamente. Cualquiera de estas mutaciones reduce la capacidad de una célula transducida que comprende el receptor de unión a antígeno para liberar citocinas sin afectar a su capacidad de proliferación y se puede usar ventajosamente para prolongar la viabilidad y, por tanto, el potencial terapéutico de las células transducidas. O, en otras palabras, dicha mutación no funcional potencia preferentemente la persistencia de las células que se transducen con el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento. *in vivo*. Sin embargo, estos motivos de señalización pueden estar presentes en cualquier sitio dentro del dominio intracelular del receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento.

Péptidos conectores y señal

Además, el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento puede comprender al menos un conector (o "espaciador"). Un conector es, en general, un péptido que tiene una longitud de hasta 20 aminoácidos. En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, el conector puede tener una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos. Por ejemplo, el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento puede comprender un conector entre el dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado, el dominio transmembranario de anclaje, el dominio de señalización coestimulante y/o el dominio de señalización estimulante. Dichos conectores tienen la ventaja de que incrementan la probabilidad de que los diferentes polipéptidos del receptor de unión a antígeno (es decir, el dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado, el dominio transmembranario de anclaje, el dominio de señalización coestimulante y/o el dominio de señalización estimulante) se plieguen independientemente y se comporten como se espera. Por tanto, en el contexto de la presente divulgación, el dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado, el dominio transmembranario de anclaje que no tiene un sitio de escisión para proteasas de mamíferos, el dominio de señalización coestimulante y el dominio de señalización estimulante pueden estar comprendidos en un polipéptido multifuncional monocatenario. Una construcción de fusión monocatenaria, por ejemplo, puede consistir en (un) polipéptido(s) que comprende(n) un dominio(s) extracelular(es) que comprende(n) al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado, (un) dominio(s) transmembranario de anclaje, (un) dominio(s) de señalización coestimulante y/o (un) dominio(s) de señalización estimulante. En modos de realización alternativos, el receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que no es una construcción de fusión monocatenaria, es decir, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab o crossFab. En dichos modos de realización, el receptor de unión a antígeno no es una construcción de fusión monocatenaria que comprende solo una cadena polipeptídica. Preferentemente, dichas construcciones comprenderán un polipéptido de fusión monocatenario de la cadena pesada combinado con una cadena ligera de inmunoglobulina como se describen en el presente documento, por ejemplo, el polipéptido de fusión de la cadena pesada comprende (una) cadena(s) pesada(s) de inmunoglobulina, (un) dominio(s) transmembranario de anclaje, (un) dominio(s) de señalización coestimulante y/o (un) dominio(s) de señalización estimulante y se combina con (una) cadena(s) ligera(s) de inmunoglobulina. En consecuencia, el resto de unión a antígeno, el dominio transmembranario de anclaje, el dominio de señalización coestimulante y el dominio de señalización estimulante se pueden conectar por uno o más conectores peptídicos idénticos o diferentes, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento, el conector entre el dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado y el dominio transmembranario de anclaje puede comprender o consistir en la amino y secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 17. En consecuencia, el dominio transmembranario de anclaje, el dominio de señalización coestimulante y/o el dominio estimulante se pueden conectar entre sí mediante conectores peptídicos o, de forma alternativa, mediante fusión directa de los dominios.

En algunos modos de realización de acuerdo con la presente divulgación, el resto de unión a antígeno comprendido en el dominio extracelular es un fragmento variable monocatenario (scFv) que es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de un anticuerpo, conectada con un péptido conector corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. Normalmente, el conector es rico en glicina para aportar flexibilidad, así como en serina o treonina para aportar solubilidad, y puede conectar el extremo N de VH con el extremo C de VL, o viceversa. Por ejemplo, en el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento, el conector puede tener la amino y secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 16. El resto de unión a antígeno scFv como se describe en el presente documento retiene la especificidad del anticuerpo original, a pesar de la retirada de las regiones constantes y la introducción del conector. Los anticuerpos scFv se describen, por ejemplo, en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96.

En algunos modos de realización de acuerdo con la presente divulgación, el resto de unión a antígeno comprendido en el dominio extracelular es un fragmento Fab monocatenario o scFab es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH), un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo y un conector, en el que dichos dominios de anticuerpo y dicho conector tienen uno de los siguientes órdenes en sentido de N terminal a C terminal: a) VH-CH1-conector-VL-CL, b) VL-CL-conector-VH-CH1, c) VH-CL-conector-VL-CH1 o d) VL-CH1-conector-VH-CL; y en el que dicho conector es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferentemente de entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab monocatenarios se estabilizan por medio del enlace disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1.

En algunos modos de realización de acuerdo con la presente divulgación, el resto de unión a antígeno comprendido en el dominio extracelular es un fragmento Fab monocatenario de entrecruzamiento es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo y un conector, en el que dichos dominios de anticuerpo y dicho conector tienen uno de los siguientes

órdenes en sentido de N terminal a C terminal: a) VH-CL-conector-VL-CH1 y b) VL-CH1-conector-VH-CL; en el que VH y VL forman juntos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno y en el que dicho conector es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos.

El receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento, o partes del mismo, puede comprender un péptido señal. Dicho péptido señal llevará la proteína hasta la superficie de la membrana del linfocito T. Por ejemplo, en el receptor de unión a antígeno proporcionado en el presente documento, el péptido señal puede tener la amino y secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 110 (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 111).

Receptores de unión a antígeno activadores de linfocitos T que se pueden unir específicamente a dominios Fc mutados

Los componentes de los receptores de unión a antígeno como se describen en el presente documento se pueden fusionar entre sí en una variedad de configuraciones para generar receptores de unión a antígeno activadores de linfocitos T.

En algunos modos de realización, el receptor de unión a antígeno comprende un dominio extracelular compuesto por un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena ligera (VL) conectados a un dominio transmembranario de anclaje. En algunos modos de realización, el dominio VH se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio VL, opcionalmente a través de un conector peptídico. En otros modos de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización estimulante y/o un dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización específico de este tipo, el receptor de unión a antígeno consiste esencialmente en un dominio VH y un dominio VL, un dominio transmembranario de anclaje y, opcionalmente, un dominio de señalización estimulante conectados por uno o más conectores peptídicos, en el que el dominio VH se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio VL, y el dominio VL se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, en el que el dominio transmembranario de anclaje se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulante. Opcionalmente, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización específico de este tipo, el receptor de unión a antígeno consiste esencialmente en un dominio VH y un dominio VL, un dominio transmembranario de anclaje, un dominio de señalización estimulante y un dominio de señalización coestimulante conectados por uno o más conectores peptídicos, en el que el dominio VH se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio VL, y el dominio VL se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, en el que el dominio transmembranario de anclaje se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulante, en el que el dominio de señalización estimulante se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización alternativo, el dominio de señalización coestimulante se conecta al dominio transmembranario de anclaje en lugar de al dominio de señalización estimulante. En un modo de realización preferente, el receptor de unión a antígeno consiste esencialmente en un dominio VH y un dominio VL, un dominio transmembranario de anclaje, un dominio de señalización coestimulante y un dominio de señalización estimulante conectados por uno o más conectores peptídicos, en el que el dominio VH se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio VL, y el dominio VL se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, en el que el dominio transmembranario de anclaje se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización coestimulante, en el que el dominio de señalización coestimulante se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulante.

En modos de realización preferentes, uno de los restos de unión es un fragmento Fab o un fragmento crossFab. En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab o crossFab al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, opcionalmente a través de un conector peptídico. En un modo de realización alternativo, el resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena ligera de Fab o crossFab al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, opcionalmente a través de un conector peptídico. En otros modos de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización estimulante y/o un dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización específico de este tipo, el receptor de unión a antígeno consiste esencialmente en un fragmento Fab o crossFab, un dominio transmembranario de anclaje y, opcionalmente, un dominio de señalización estimulante conectados por uno o más conectores peptídicos, en el que el fragmento Fab o crossFab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada o ligera al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, en el que el dominio transmembranario de anclaje se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulante. Preferentemente, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización de este tipo, el receptor de unión a antígeno consiste esencialmente en un fragmento Fab o crossFab, un dominio transmembranario de anclaje, un dominio de señalización estimulante y un dominio de señalización coestimulante conectados por uno o más conectores peptídicos, en el que el fragmento Fab o crossFab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada o ligera al extremo N del dominio transmembranario de anclaje, en el que el dominio de señalización estimulante se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización preferente, el dominio de señalización coestimulante se conecta al dominio transmembranario de anclaje en lugar de al dominio de señalización estimulante. En un modo de realización preferente, el receptor de unión a antígeno consiste esencialmente en un fragmento Fab o crossFab,

un dominio transmembranario de anclaje, un dominio de señalización coestimulante y un dominio de señalización estimulante, en el que el fragmento Fab o crossFab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada al extremo N del dominio transmembranario de anclaje a través de un conector peptídico, en el que el dominio transmembranario de anclaje se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización coestimulante, en el que el dominio de señalización coestimulante se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulante.

El resto de unión a antígeno, el dominio transmembranario de anclaje y los dominios de señalización estimulante y/o señalización coestimulante se pueden fusionar entre sí directamente o a través de uno o más conectores peptídicos, que comprenden uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos. Los conectores peptídicos son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en los que "n" es, en general, un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4. Un conector peptídico preferente para conectar el resto de unión a antígeno y el resto transmembranario de anclaje es $GGGGS$ (G_4S) de acuerdo con SEQ ID NO: 17. Un conector peptídico ejemplar adecuado para conectar la cadena pesada variable (VH) y la cadena ligera variable (VL) es $GGGSGGGSGGGSGGGS$ $(G_4S)_4$ de acuerdo con SEQ ID NO: 16.

Adicionalmente, los conectores pueden comprender (una porción de) una región bisagra de inmunoglobulina. En particular, cuando un resto de unión a antígeno se fusiona al extremo N de un dominio transmembranario de anclaje, se puede fusionar por medio de una región bisagra de inmunoglobulina o una porción de la misma, con o sin un conector peptídico adicional.

Como se describe en el presente documento, los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación comprenden un dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno. Un receptor de unión a antígeno con un único resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana es útil y preferente, en particular en casos donde se necesita una alta expresión del receptor de unión a antígeno. En dichos casos, la presencia de más de un resto de unión a antígeno específico para el antígeno de célula diana puede limitar la eficacia de expresión del receptor de unión a antígeno. En otros casos, sin embargo, será ventajoso tener un receptor de unión a antígeno que comprenda dos o más restos de unión a antígeno, por ejemplo, para optimizar la dirección al sitio diana o para permitir la reticulación de antígenos de células diana.

En un modo de realización particular, el receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado, en particular, un dominio Fc de IgG1, que comprende la mutación P329G. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado es un scFv, un Fab o un crossFab.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C del fragmento scFv o en el extremo C de la cadena pesada de Fab o crossFab al extremo N de un dominio transmembranario de anclaje, opcionalmente a través de un conector peptídico. En un modo de realización, el conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos $GGGGS$ (SEQ ID NO: 16). En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje es un dominio transmembranario seleccionado del grupo que consiste en el dominio transmembranario de CD8, de CD3z, de FCGR3A, de NKG2D, de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 o de DAP12 o un fragmento del mismo. En un modo de realización preferente, el dominio transmembranario de anclaje es el dominio transmembranario de CD28 o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio transmembranario de anclaje comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de $FWVLVVVGGVLAQYSELVTVAHPFWV$ (SEQ ID NO: 11). En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización coestimulante (CSD). En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje del receptor de unión a antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N de un dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización, el dominio de señalización coestimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 y de DAP12, o fragmentos de los mismos, como se describe anteriormente en el presente documento. En un modo de realización preferente, el dominio de señalización coestimulante es el dominio intracelular de CD28 o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio de señalización coestimulante comprende o consiste en la secuencia $RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS$ (SEQ ID NO: 12). En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización estimulante. En un modo de realización, el dominio de señalización coestimulante del receptor de unión a antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulante. En un modo de realización, el al menos un dominio de señalización estimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD3z, FCGR3A y NKG2D, o fragmentos de los mismos. En un modo de realización preferente, el dominio de señalización coestimulante es el dominio intracelular de CD3z o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio de señalización coestimulante comprende o consiste en la secuencia:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ

EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR (SEQ ID NO: 13).

- 5 En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno se fusiona a una proteína indicadora, en particular, a GFP o análogos potenciados de la misma. En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N de eGFP (proteína verde fluorescente potenciada), opcionalmente a través de un conector peptídico como se describe en el presente documento. En un modo de realización preferente, el conector peptídico es **GEGRGSLITCGIDVFENPGP** (T2A) de acuerdo con SEQ ID NO: 18.
- 10 En un modo de realización particular, el receptor de unión a antígeno comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno, en el que el al menos un resto de unión a antígeno es un fragmento scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el dominio Fc mutado comprende la mutación P329G. La mutación P329G reduce la unión al receptor de Fcy. En un modo de realización, el receptor
- 15 de unión a antígeno de la presente divulgación comprende un dominio transmembranario de anclaje (ATD), un dominio de señalización coestimulante (CSD) y un dominio de señalización estimulante (SSD). En un modo de realización de este tipo, el receptor de unión a antígeno tiene la configuración scFv-ATD-CSD-SSD. En un modo de realización preferente, el receptor de unión a antígeno tiene la configuración scFv-G₄S-ATD-CSD-SSD, en la que G₄S es un conector que comprende la secuencia **GGGGS** de SEQ ID NO: 17. Opcionalmente, se puede
- 20 añadir una proteína indicadora al extremo C del receptor de unión a antígeno, opcionalmente a través de un conector peptídico.
- En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno es un fragmento scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno
- 25 comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.
- En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un scFv que se puede unir específicamente
- 30 a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR H) 1 **RYWMN** (SEQ ID NO: 1), la secuencia de aminoácidos de CDR H2 **EITPDSSTINYTPSLKD** (SEQ ID NO: 2), la secuencia de aminoácidos de CDR H3 **PYDYGAWTAS** (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR L) 1 **RSSTGAVTTSNYAN** (SEQ ID NO: 4), la secuencia de
- 35 aminoácidos de CDR L2 **GTNKRAP** (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de aminoácidos de CDR L3 **ALWYSNIIWV** (SEQ ID NO: 6).
- En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C:
- 40 (i) un resto de unión a antígeno que es un fragmento scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el fragmento scFv comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2, la CDR 3 de la cadena pesada de
- 45 SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera (VH) que comprende la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 6;
- (ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;
- 50 (iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;
- (iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y
- 55 (iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13.
- En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C:
- 60 (i) un resto de unión a antígeno que es una molécula scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc

mutado que comprende la mutación P329G, en el que el scFv comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) seleccionado de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 32 y el dominio variable de la cadena ligera (VL) seleccionado de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 33;

5 (ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

(iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

10 (iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

(iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13.

15 En un modo de realización preferente, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C

20 (i) un resto de unión a antígeno que es una molécula scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el scFv comprende el dominio variable de la cadena pesada (VH) SEQ ID NO: 8 y el dominio variable de la cadena ligera (VL) SEQ ID NO: 9;

(ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

25 (iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

(iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

30 (iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13.

35 En un modo de realización preferente, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C

(i) un resto de unión a antígeno que es una molécula scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el scFv comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 34;

40 (ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

(iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

45 (iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

50 (iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13.

55 En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el receptor de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 31.

60 En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el receptor de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 31.

65 En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N del dominio transmembranario de anclaje. En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje es un dominio transmembranario seleccionado del grupo que consiste en el dominio transmembranario de CD8, de CD3z, de FCGR3A, de NKG2D, de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 o de DAP12 o un fragmento del mismo. En un modo de realización preferente, el dominio transmembranario de anclaje es el dominio

transmembranario de CD28 o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio transmembranario de anclaje es **FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFILFWV** (SEQ ID NO: 11). En un modo

de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización coestimulante (CSD). En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje del receptor de unión a antígeno se

fusiona en el extremo C al extremo N de un dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización, el dominio de señalización coestimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 y DAP12, o fragmentos de los mismos, como se describe

anteriormente en el presente documento. En un modo de realización preferente, el dominio de señalización coestimulante es el dominio intracelular de CD28 o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular,

el dominio de señalización coestimulante comprende o consiste en la secuencia: **RSKRSRLHSDYMNMTTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS** (SEQ ID NO: 12). En un modo de realización,

el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización estimulante. En un modo de realización, el dominio de señalización coestimulante del receptor de unión a antígeno se fusiona en el extremo C

al extremo N del dominio de señalización estimulante. En un modo de realización, el al menos un dominio de señalización estimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD3z, FCGR3A y NKG2D, o fragmentos de los mismos. En un modo de realización preferente, el dominio de señalización

coestimulante es el dominio intracelular de CD3z o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio de señalización coestimulante comprende o consiste en la secuencia:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQ

EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP

PR (SEQ ID NO: 13).

En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno se fusiona a una proteína indicadora, en particular, a GFP o análogos potenciados de la misma. En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno se fusiona

en el extremo C al extremo N de eGFP (proteína verde fluorescente potenciada), opcionalmente a través de un conector peptídico como se describe en el presente documento. En un modo de realización preferente, el conector

peptídico es **GEGRGSLTCCGDVEENPGP** (T2A) de SEQ ID NO: 18.

En un modo de realización particular, el receptor de unión a antígeno comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno, en el que el al menos un

resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el dominio Fc mutado comprende la

mutación P329G, en el que la mutación P329G reduce la unión al receptor de Fcγ. En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación comprende un dominio transmembranario de anclaje

(ATD), un dominio de señalización coestimulante (CSD) y un dominio de señalización estimulante (SSD). En un modo de realización de este tipo, el receptor de unión a antígeno tiene la configuración Fab-ATD-CSD-SSD. En un

modo de realización preferente, el receptor de unión a antígeno tiene la configuración Fab-G4S-ATD-CSD-SSD, en la que G4S es un conector que comprende la secuencia **GGGGS** de SEQ ID NO: 17. Opcionalmente, se puede

añadir una proteína indicadora al extremo C del receptor de unión a antígeno, opcionalmente a través de un conector peptídico.

En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que

comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y al menos una CDR de la cadena ligera

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

En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el resto de unión a antígeno

comprende la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR H) 1 **RYWMN** (SEQ ID NO: 1), la secuencia de aminoácidos de CDR H2 **EITPDSSTINYTPSLKD** (SEQ ID NO: 2), la secuencia

de aminoácidos de CDR H3 **PYDYGAWFAS** (SEQ ID NO: 3), la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR L) 1 **RSSTGAVTTSNYAN** (SEQ ID NO: 4),

la secuencia de aminoácidos de CDR L2 **GTNKRAP** (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de aminoácidos de CDR L3 **ALWYSNHWV** (SEQ ID NO: 6).

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C

(i) un resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc

mutado que comprende la mutación P329G, que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 3 y la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 6;

(ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

(iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

(iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

(iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13.

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende:

a) un polipéptido de fusión de la cadena pesada que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

(i) una cadena pesada que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 3;

(ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

(iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

(iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

(iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13 y

b) una cadena ligera que comprende el CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y el CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 6.

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende:

a) un polipéptido de fusión de la cadena pesada que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

(i) el dominio variable de la cadena pesada (VH) SEQ ID NO: 8;

(ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

(iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

(iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

(iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13 y

b) el dominio variable de la cadena ligera (VL) SEQ ID NO: 9.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que comprende una cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 49 y una cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 50. En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que comprende una cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

- En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el receptor de unión a antígeno comprende un polipéptido de fusión de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 48 y un polipéptido de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 50.
- En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende la mutación P329G, en el que el receptor de unión a antígeno comprende un polipéptido de fusión de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y un polipéptido de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.
- En un modo de realización alternativo, el receptor de unión a antígeno comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado, en particular, un dominio Fc de IgG1, que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A ("AAA"). En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado es un scFv, un Fab o un crossFab.
- En un modo de realización, el resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C del fragmento scFv o en el extremo C de la cadena pesada de Fab o crossFab al extremo N de un dominio transmembranario de anclaje, opcionalmente a través de un conector peptídico. En un modo de realización, el conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos **GGGG** (SEQ ID NO: 16). En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje es un dominio transmembranario seleccionado del grupo que consiste en el dominio transmembranario de CD8, de CD3z, de FCGR3A, de NKG2D, de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 o de DAP12 o un fragmento del mismo. En un modo de realización preferente, el dominio transmembranario de anclaje es el dominio transmembranario de CD28 o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio transmembranario de anclaje comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de **FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV** (SEQ ID NO: 11). En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización coestimulante (CSD). En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje del receptor de unión a antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N de un dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización, el dominio de señalización coestimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 y de DAP12, o fragmentos de los mismos, como se describe anteriormente en el presente documento. En un modo de realización preferente, el dominio de señalización coestimulante es el dominio intracelular de CD28 o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio de señalización coestimulante comprende o consiste en la secuencia: **RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS** (SEQ ID NO: 12). En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización estimulante. En un modo de realización, el dominio de señalización coestimulante del receptor de unión a antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulante. En un modo de realización, el al menos un dominio de señalización estimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD3z, FCGR3A y NKG2D, o fragmentos de los mismos. En un modo de realización preferente, el dominio de señalización coestimulante es el dominio intracelular de CD3z o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio de señalización coestimulante comprende o consiste en la secuencia: **RYKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREFYDVLDKRRGRDPFMGGKPRRKNPQ**
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR SEQ ID NO: 13).
- En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno se fusiona a una proteína indicadora, en particular, a GFP o análogos potenciados de la misma. En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N de eGFP (proteína verde fluorescente potenciada), opcionalmente a través de un conector peptídico como se describe en el presente documento. En un modo de realización preferente, el conector peptídico es **GEGRGSLTTCGDVEENPGP** (T2A) de acuerdo con SEQ ID NO: 18.
- En un modo de realización particular, el receptor de unión a antígeno comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno, en el que el al menos un resto de unión a antígeno es un fragmento scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el dominio Fc mutado comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A. Las mutaciones I253A, H310A y H435A reducen la unión al receptor FcRn.

En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación comprende un dominio transmembranario de anclaje (ATD), un dominio de señalización coestimulante (CSD) y un dominio de señalización estimulante (SSD). En un modo de realización de este tipo, el receptor de unión a antígeno tiene la configuración scFv-ATD-CSD-SSD. En un modo de realización preferente, el receptor de unión a antígeno tiene la configuración

5 scFv-G₄S-ATD-CSD-SSD, en la que G₄S es un conector que comprende la secuencia **GUGGS** de SEQ ID NO: 17. Opcionalmente, se puede añadir una proteína indicadora al extremo C del receptor de unión a antígeno, opcionalmente a través de un conector peptídico.

10 En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno es un fragmento scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el resto de unión a antígeno comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58.

15 En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el resto de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR H) 1 **SYGMS** (SEQ ID NO: 53), la secuencia de aminoácidos de CDR H2 **SSGGSY** (SEQ ID NO: 54), la secuencia de aminoácidos de CDR H3 **LGMITGTYAMDY** (SEQ ID NO: 55), la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR L) 1 **RSSQTIVHISTGHTYLE** (SEQ ID NO: 56), la secuencia de aminoácidos de CDR L2 **KVSNRFS** (SEQ ID NO: 57) y la secuencia de aminoácidos de CDR L3 **FQGSIVPYT** (SEQ ID NO: 58).

25 En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

(i) un resto de unión a antígeno que es un fragmento scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el fragmento scFv comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 53, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 54, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 55 y una región variable de la cadena ligera (VH) que comprende la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 56, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 57 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 58;

35 (ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

(iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

40 (iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

(iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13.

45 En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

50 (i) un resto de unión a antígeno que es una molécula scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el scFv comprende el dominio variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 61 y el dominio variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 62;

(ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

55 (iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

(iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

60 (iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13.

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

- (i) un resto de unión a antígeno que es una molécula scFv que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el scFv comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60;
- (ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;
- (iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;
- (iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y
- (iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13.

En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el receptor de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 59.

En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el receptor de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 595.

En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N del dominio transmembranario de anclaje. En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje es un dominio transmembranario seleccionado del grupo que consiste en el dominio transmembranario de CD8, de CD3z, de FCGR3A, de NKG2D, de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 o de DAP12 o un fragmento del mismo. En un modo de realización preferente, el dominio transmembranario de anclaje es el dominio transmembranario de CD28 o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio

transmembranario de anclaje es **FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV** (SEQ ID NO: 11). En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización coestimulante (CSD). En un modo de realización, el dominio transmembranario de anclaje del receptor de unión a antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N de un dominio de señalización coestimulante. En un modo de realización, el dominio de señalización coestimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 y DAP12, o fragmentos de los mismos, como se describe anteriormente en el presente documento. En un modo de realización preferente, el dominio de señalización coestimulante es el dominio intracelular de CD28 o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio de señalización coestimulante comprende o consiste en la secuencia **RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS** (SEQ ID NO: 12). En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un dominio de señalización estimulante. En un modo de realización, el dominio de señalización coestimulante del receptor de unión a antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N del dominio de señalización estimulante. En un modo de realización, el al menos un dominio de señalización estimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD3z, FCGR3A y NKG2D, o fragmentos de los mismos. En un modo de realización preferente, el dominio de señalización coestimulante es el dominio intracelular de CD3z o un fragmento del mismo. En un modo de realización particular, el dominio de señalización coestimulante comprende o consiste en la secuencia: **RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQ**
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKCHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
PR (SEQ ID NO: 13).

En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno se fusiona a una proteína indicadora, en particular, a GFP o análogos potenciados de la misma. En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno se fusiona en el extremo C al extremo N de eGFP (proteína verde fluorescente potenciada), opcionalmente a través de un conector peptídico como se describe en el presente documento. En un modo de realización preferente, el conector peptídico es **GEGRGSLTTCGDVEENPGP** (T2A) de SEQ ID NO: 18.

En un modo de realización particular, el receptor de unión a antígeno comprende un dominio transmembranario de

anclaje y un dominio extracelular que comprende al menos un resto de unión a antígeno, en el que el al menos un resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el dominio Fc mutado comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que las mutaciones I253A, H310A y H435A reducen la unión al receptor FcRn. En un modo de realización, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación comprende un dominio transmembranario de anclaje (ATD), un dominio de señalización coestimulante (CSD) y un dominio de señalización estimulante (SSD). En un modo de realización de este tipo, el receptor de unión a antígeno tiene la configuración Fab-ATD-CSD-SSD. En un modo de realización preferente, el receptor de unión a antígeno tiene la configuración Fab-G4S-ATD-CSD-SSD, en la que G4S es un conector que comprende la secuencia **GGGGS** de SEQ ID NO: 17. Opcionalmente, se puede añadir una proteína indicadora al extremo C del receptor de unión a antígeno, opcionalmente a través de un conector peptídico.

En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58.

En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el resto de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR H) 1 **SYGMS** (SEQ ID NO: 53), la secuencia de aminoácidos de CDR H2 **SSGGSY** (SEQ ID NO: 54), la secuencia de aminoácidos de CDR H3 **LGMITGTYAMDY** (SEQ ID NO: 55), la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR L) 1 **RSSQTIVHSTGHTYLE** (SEQ ID NO: 56), la secuencia de aminoácidos de CDR L2 **KVSNRFS** (SEQ ID NO: 57) y la secuencia de aminoácidos de CDR L3 **FQGSHVPYT** (SEQ ID NO: 58).

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C

(i) un resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 53, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 54, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 55 y la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 56, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 57 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 58;

(ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

(iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

(iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

(iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13.

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende:

a) un polipéptido de fusión de la cadena pesada que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

(i) una cadena pesada que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 53, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 54, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 55;

(ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

(iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

(iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

(iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13 y

b) una cadena ligera que comprende el CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 56, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 57 y el CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 58.

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un receptor de unión a antígeno que comprende:

a) un polipéptido de fusión de la cadena pesada que comprende, en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

(i) el dominio variable de la cadena pesada (VH) SEQ ID NO: 61;

(ii) un conector peptídico, en particular, el conector peptídico de SEQ ID NO: 17;

(iii) un dominio transmembranario de anclaje, en particular, el dominio transmembranario de anclaje de SEQ ID NO: 11;

(iii) un dominio de señalización coestimulante, en particular, el dominio de señalización coestimulante de SEQ ID NO: 12; y

(iv) un dominio de señalización estimulante, en particular, el dominio de señalización estimulante de SEQ ID NO: 13 y

b) el dominio variable de la cadena ligera (VL) SEQ ID NO: 62.

En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que comprende una cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y una cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65.

En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el receptor de unión a antígeno comprende un polipéptido de fusión de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y un polipéptido de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65.

En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno es un fragmento Fab que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, en el que el receptor de unión a antígeno comprende un polipéptido de fusión de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y un polipéptido de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65.

En determinados modos de realización alternativos, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación, el polipéptido de la cadena ligera de Fab y el polipéptido de fusión de la cadena pesada de Fab se fusionan entre sí, opcionalmente por medio de un péptido conector. La fusión de las cadenas pesada y ligera de Fab puede mejorar el emparejamiento de cadenas pesada y ligera de Fab y también reduce el número de plásmidos necesarios para la expresión de algunos de los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación. Una estrategia alternativa para reducir el número de plásmidos necesarios para la expresión del receptor de unión a antígeno es el uso de un sitio interno de entrada ribosomal para permitir la expresión de construcciones tanto de la cadena pesada como de la ligera a partir del mismo plásmido, como se ilustra, por ejemplo, en la figura 2.

En determinados modos de realización, el receptor de unión a antígeno comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab del resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab del resto de unión a antígeno (es decir, el resto de unión a antígeno comprende una cadena pesada de crossFab, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con el dominio transmembranario de anclaje (VL₍₁₎-CH1₍₁₎-ATD). En algunos modos de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno (VH₍₁₎-CL₍₁₎). En determinados modos de realización, los polipéptidos se enlazan covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro. En modos de realización alternativos, el receptor de unión a antígeno comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab del resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab del resto de unión a antígeno (es decir, el resto de unión a antígeno

comprende una cadena pesada de crossFab, en la que la región constante de la cadena pesada se reemplaza por una región constante de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con el dominio transmembranario de anclaje (VH₍₁₎-CL₍₁₎-ATD). En algunos modos de realización, el receptor de unión a antígeno comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab del resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab del resto de unión a antígeno (VL₍₁₎-CH1₍₁₎). En determinados modos de realización, los polipéptidos se enlazan covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro.

De acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores, los componentes del receptor de unión a antígeno (por ejemplo, VH y VL, resto de unión a antígeno, dominio transmembranario de anclaje, dominio de señalización coestimulante, dominio de señalización estimulante) se pueden fusionar directamente o a través de diversos conectores, en particular, conectores peptídicos que comprenden uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos, que se describen en el presente documento o son conocidos en la técnica. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos (G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n o G₄(SG₄)_n, en los que "n" es, en general, un número entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 4.

Receptores de unión a antígeno activadores de linfocitos T ejemplares

Como se muestra ilustrativamente en los ejemplos adjuntos y en la figura 1A, como prueba de concepto de la presente divulgación, se construyó el receptor de unión a antígeno "anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17096" (SEQ ID NO: 7) que comprende un resto de unión a antígeno de scFv estabilizado que se une a / se dirige contra / interactúa con o sobre un anticuerpo que comprende la mutación P329G en el dominio Fc. La construcción comprende además el dominio transmembranario de CD28, un fragmento de CD28 como dominio de señalización coestimulante y un fragmento de CD3z como dominio de señalización estimulante. Las secuencias (aminoácidos y ADNc) de la molécula de unión a anticuerpo "anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17096" se muestran en las tablas 2 y 3.

Además, como se ilustra en la Fig. 1B, como otra prueba de concepto de la presente divulgación, se construyó el receptor de unión a antígeno "anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17100" (SEQ ID NO: 39, 41) que comprende un resto de unión a antígeno de Fab estabilizado que se une a / se dirige contra / interactúa con o sobre un anticuerpo que comprende la mutación P329G en el dominio Fc. La construcción comprende además el dominio transmembranario de CD28, un fragmento de CD28 como dominio de señalización coestimulante y un fragmento de CD3z como dominio de señalización estimulante. Las secuencias (aminoácidos y ADNc) de la molécula de unión a antígeno "anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17100" se muestran en las tablas 4 y 5.

Como otra prueba de concepto de la presente divulgación, se construyó el receptor de unión a antígeno "anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17594" (SEQ ID NO: 48, 50) que comprende un resto de unión a antígeno de Fab que se une a / se dirige contra / interactúa con o sobre un anticuerpo que comprende la mutación P329G en el dominio Fc. La construcción comprende además el dominio transmembranario de CD28, un fragmento de CD28 como dominio de señalización coestimulante y un fragmento de CD3z como dominio de señalización estimulante. Las secuencias (aminoácidos y ADNc) del receptor de unión a antígeno "anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17594" se muestran en las tablas 6 y 7.

Como otra prueba de concepto de la presente divulgación, se construyó el receptor de unión a antígeno "anti-AAA scFv" (SEQ ID NO: 59) que comprende un resto de unión a antígeno de scFv que se une a / se dirige contra / interactúa con o sobre un anticuerpo que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A en el dominio Fc. La construcción comprende además el dominio transmembranario de CD28, un fragmento de CD28 como dominio de señalización coestimulante y un fragmento de CD3z como dominio de señalización estimulante. Las secuencias (aminoácidos y ADNc) de la molécula de unión a anticuerpo "anti-AAA scFv" se muestran a continuación en las tablas 8 y 9.

Como otra prueba de concepto de la presente divulgación, se construyó el receptor de unión a antígeno "anti-AAA scFv" (SEQ ID NO: 63, 65) que comprende un resto de unión a antígeno de Fab que se une a / se dirige contra / interactúa con o sobre un anticuerpo que comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A en el dominio Fc. La construcción comprende además el dominio transmembranario de CD28, un fragmento de CD28 como dominio de señalización coestimulante y un fragmento de CD3z como dominio de señalización estimulante. Las secuencias (aminoácidos y ADNc) de la molécula de unión a anticuerpo "anti-AAA scFv" se muestran a continuación en las tablas 10 y 11.

La presente divulgación también proporciona (una) molécula(s) de ácido nucleico que codifica(n) receptores de unión a antígeno de la presente divulgación como se describe en el presente documento. La presente divulgación también abarca (una) molécula(s) de ácido nucleico que codifica(n) los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación y kits que comprenden (una) molécula(s) de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación como se describe además en el presente documento.

Kits

Otro aspecto de la presente divulgación son kits que comprenden o consisten en un ácido nucleico que codifica un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación y/o células, preferentemente linfocitos T transducidos con receptores de unión a antígeno de la presente divulgación y, opcionalmente, (un) anticuerpo(s) que comprende(n) un dominio Fc mutado, en el que el receptor de unión a antígeno se puede unir específicamente al dominio Fc mutado.

En consecuencia, se proporciona un kit que comprende

- (A) un linfocito T transducido que puede expresar un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación; y
- (B) un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado;

en el que el receptor de unión a antígeno se puede unir específicamente al dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado.

Se proporciona además un kit que comprende

- (A) un polinucleótido y/o un vector aislados que codifican un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación; y
- (B) un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado;

en el que el receptor de unión a antígeno se puede unir específicamente al dominio Fc mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado.

En el contexto de la presente divulgación, los kits de la presente divulgación pueden comprender linfocitos T transducidos, polinucleótidos y/o vectores aislados y uno o más anticuerpos que comprenden un dominio Fc mutado. En modos de realización particulares, el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico, por ejemplo, un anticuerpo específico de tumor. Los antígenos específicos de tumor son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. En el contexto de la presente divulgación, el anticuerpo se administra antes de, simultáneamente con o después de la administración de un linfocito T transducido que expresa un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación. Los kits de acuerdo con la presente divulgación comprenden linfocitos T transducidos o polinucleótidos/vectores para generar linfocitos T transducidos. En este contexto, los linfocitos T transducidos son linfocitos T universales, ya que no son específicos para un tumor determinado sino que se pueden dirigir a cualquier tumor dependiendo del anticuerpo terapéutico que comprenda el dominio Fc mutado. En el presente documento se proporcionan ejemplos de anticuerpos que comprenden un dominio Fc mutado; sin embargo, en los kits proporcionados en el presente documento se puede incluir cualquier anticuerpo que comprenda un dominio Fc mutado como se describe en el presente documento. En modos de realización particulares, el dominio Fc mutado de los anticuerpos presenta afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc mutado (o el anticuerpo que comprende dicho dominio Fc mutado) presenta menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor de Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural), y/o menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural). En un modo de realización, el dominio Fc mutado (o el anticuerpo que comprende dicho dominio Fc mutado) no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o induce función efectora. En un modo de realización particular, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ. En un modo de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En un modo de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ humano activador, más específicamente, FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, lo más específicamente FcγRIIIa humano. En un modo de realización, la función efectora es una o más seleccionada del grupo de CDC, ADCC, ADCP y secreción de citocinas. En un modo de realización particular, la función efectora es ADCC. En un modo de realización, el dominio Fc mutado presenta una afinidad de unión sustancialmente alterada por el receptor de Fc neonatal (FcRn), en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. En un modo de realización, el anticuerpo que comprende el dominio Fc mutado presenta menos de un 20 %, en particular menos de un 10 %, más en particular menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor de Fc en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc no genomanipulado. En un modo de realización particular, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ. En algunos modos de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En algunos modos de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ humano activador, más específicamente, FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, lo más específicamente FcγRIIIa humano. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. En algunos modos de realización, también se reduce la afinidad de unión por un componente del complemento, específicamente la afinidad de unión por C1q.

En determinados modos de realización, se muta el dominio Fc del anticuerpo para que tenga una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no mutado. La función efectora reducida puede incluir, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación reducida de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos, unión reducida a linfocitos NK, unión reducida a macrófagos, unión reducida a monocitos, unión reducida a células polimorfonucleares, señalización directa que induce apoptosis reducida, reticulación de anticuerpos unidos a diana reducida, maduración de células dendríticas reducida o sensibilización de linfocitos T reducida. En un modo de realización, la función efectora reducida es una o más seleccionadas del grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida y secreción de citocinas reducida. En un modo de realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En un modo de realización, la ADCC reducida es menos de un 20 % de la ADCC inducida por un dominio Fc no genomanipulado (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc no genomanipulado).

En un modo de realización, la mutación aminoacídica que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc y/o la función efectora es una sustitución aminoacídica. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición seleccionada del grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329. En un modo de realización más específico, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición seleccionada del grupo de L234, L235 y P329. En algunos modos de realización, el dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas L234A y L235A. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular, un dominio Fc de IgG₁ humana. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329. En un modo de realización más específico, la sustitución aminoacídica es P329A o P329G, en particular, P329G. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329 y otra sustitución aminoacídica en una posición seleccionada de E233, L234, L235, N297 y P331. En un modo de realización más específico, la otra sustitución aminoacídica es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En modos de realización particulares, el dominio Fc comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones P329, L234 y L235. En un modo de realización, el dominio Fc comprende las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("P329G LALA"). En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular, un dominio Fc de IgG₁ humana. La combinación "P329G LALA" de sustituciones aminoacídicas suprime casi completamente la unión al receptor de Fcγ (así como al complemento) de un dominio Fc de IgG₁ humana, como se describe en la publicación PCT n.º WO 2012/130831. El documento WO 2012/130831 también describe procedimientos de preparación de dichos dominios Fc mutantes y procedimientos para determinar sus propiedades, tales como unión al receptor de Fc o funciones efectoras.

En un modo de realización particular, el dominio Fc que presenta afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural, es un dominio Fc de IgG₁ humana que comprende las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y, opcionalmente, P329G, o un dominio Fc de IgG₄ humana que comprende las mutaciones aminoacídicas S228P, L235E y, opcionalmente, P329G.

En determinados modos de realización se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc comprende una mutación aminoacídica en la posición N297, en particular una mutación aminoacídica que reemplaza asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en el presente documento y en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, los dominios Fc con unión al receptor de Fc y/o función efectora reducidas también incluyen aquellos con mutación en uno o más de los residuos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 del dominio Fc (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con mutaciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con mutación en los residuos 265 y 297 a alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

Se pueden preparar dominios Fc mutantes por delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios de nucleótidos correctos se pueden verificar, por ejemplo, por secuenciación.

La unión a receptores de Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, por ELISA, o por resonancia de plasmón superficial (RPS) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores de Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. De forma alternativa, se puede evaluar la afinidad de unión de dominios Fc o moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos que comprenden un dominio Fc por los receptores de Fc usando líneas celulares conocidas por expresar receptores de Fc particulares, tales como linfocitos NK humanos que expresan el receptor de FcγIIIa.

La función efectora de un dominio Fc, o un anticuerpo que comprende un dominio Fc, se puede medir por procedimientos conocidos en la técnica. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una

molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362; Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayos no radioactivos (véanse, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc., Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunos modos de realización se reduce la unión del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q. En consecuencia, en algunos modos de realización en los que el dominio Fc se genomanipula para que tenga una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye una CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si el anticuerpo se puede unir a C1q y, por tanto, tiene actividad CDC. Véanse, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

En un modo de realización, se reduce la afinidad de unión por el receptor de Fc neonatal (FcRn). En modos de realización particulares, un dominio Fc mutado de acuerdo con la presente divulgación presenta una afinidad de unión reducida por el receptor de FcRn, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc (o el anticuerpo que comprende dicho dominio Fc) presenta menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor de Fc neonatal, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural), y/o menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural). En un modo de realización, el dominio Fc mutado (o el anticuerpo que comprende dicho dominio Fc mutado) no se une sustancialmente a un receptor de Fc neonatal. En un modo de realización particular, el receptor de Fc es un receptor FcRn. En un modo de realización, el receptor de Fc es un receptor FcRn humano. En modos de realización particulares, el dominio Fc comprende sustituciones aminoácidas en las posiciones I253, H310 y H435. En modos de realización más particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones aminoácidas I253A, H310A y H435A ("AAA"). En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular, un dominio Fc de IgG₁ humana. La combinación "AAA" de sustituciones aminoácidas suprime casi por completo la unión al receptor FcRn de un dominio Fc de IgG₁ humana.

En un modo de realización específico, el anticuerpo que comprende la región Fc mutada se puede unir específicamente a CD20 y comprende la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 112 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 113. En un modo de realización, el anticuerpo que comprende la región Fc mutada se puede unir específicamente a FAP y comprende la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 114 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 115. En un modo de realización, el anticuerpo que comprende la región Fc mutada se puede unir específicamente a CEA y comprende la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 116 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 117, la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 118 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 119, la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 120 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 121 o la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 122 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 123. En otros modos de realización, el anticuerpo que comprende la región Fc mutada se puede unir específicamente a tenascina (TNC) y comprende la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 124 y la secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 125.

En otro modo de realización, el anticuerpo que comprende la región Fc mutada es un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico activador de linfocitos T. En un modo de realización de este tipo, el anticuerpo biespecífico comprende un primer resto de unión que se puede unir específicamente a una diana activadora de linfocitos T, en particular CD3, y un segundo resto de unión que se puede unir específicamente a un antígeno tumoral como se describe en el presente documento.

En un modo de realización, el anticuerpo que comprende la región Fc mutada es biespecífico y se puede unir específicamente a Her2, en el que el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de una primera cadena pesada de SEQ ID NO: 126, una secuencia de una primera cadena ligera de SEQ ID NO: 127, una secuencia de una segunda cadena pesada de SEQ ID NO: 128 y una secuencia de una segunda cadena ligera de SEQ ID NO: 129.

En un modo de realización ilustrativo de la presente divulgación, como prueba de concepto, se proporciona un kit que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 ("anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD" (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 19)) combinada

con el anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 112 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 113. De forma alternativa, el kit puede comprender una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 31 ("anti-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD" (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 35)) combinada con el anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 112 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 113. Además, en el contexto de la presente divulgación, el kit puede comprender una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 39 ("anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD" (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 44)) combinada con el anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 112 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 113. De forma alternativa, el kit puede comprender una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 48 ("anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD" (codificada por la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 51)) combinada con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 112 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 113. De forma alternativa, el kit puede comprender una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 59 ("anti-AAA-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD") combinada con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 112 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 113. Además, en el contexto de la presente divulgación, el kit puede comprender una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 63 ("anti-AAA-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD") combinada con un anticuerpo que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 112 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 113. Además, en el contexto de la presente divulgación, el kit puede comprender al menos una molécula de anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114 y SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 123, y SEQ ID NO: 124 y SEQ ID NO: 125. Además, en el contexto de la presente divulgación, el kit puede comprender una molécula de anticuerpo biespecífico, en particular un anticuerpo biespecífico que comprende una primera cadena pesada de SEQ ID NO: 128, una primera cadena ligera de SEQ ID NO: 129, una segunda cadena pesada de SEQ ID NO: 130 y una segunda cadena ligera de SEQ ID NO: 131.

Además, partes del kit de la presente divulgación se pueden envasar individualmente en viales o frascos o en combinación en recipientes o unidades multirrecipiente. Adicionalmente, el kit de la presente divulgación puede comprender un sistema de incubación de células en bolsa (cerrada) donde se pueden transducir las células del paciente, preferentemente linfocitos T como los descritos en el presente documento, con (un) receptor(es) de unión a antígeno de la presente divulgación e incubar en condiciones GMP (prácticas correctas de fabricación, como se describe en las directrices sobre prácticas correctas de fabricación publicadas por la Comisión Europea en http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/index_en.htm). Además, el kit de la presente divulgación comprende un sistema de incubación de células en bolsa (cerrada) donde se pueden transducir los linfocitos T de pacientes aislados/obtenidos con (un) receptor(es) de unión a antígeno de la presente divulgación e incubar en condiciones GMP. Además, en el contexto de la presente divulgación, el kit también puede comprender un vector que codifica (el) receptor(es) de unión a antígeno como se describe(n) en el presente documento. El kit de la presente divulgación se puede usar de forma ventajosa, entre otros, para llevar a cabo el procedimiento de la presente divulgación y se podría emplear en una variedad de aplicaciones a las que se hace referencia en el presente documento, por ejemplo, como herramientas de investigación o herramientas médicas. La fabricación de los kits sigue preferentemente procedimientos estándar que son conocidos por el experto en la técnica.

En este contexto, se pueden transducir las células derivadas del paciente, preferentemente linfocitos T, con un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado como se describe en el presente documento usando el kit como se describe anteriormente. El dominio extracelular que comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado no se encuentra de forma natural en o sobre los linfocitos T. En consecuencia, las células derivadas del paciente transducidas con los kits de la presente divulgación adquirirán la capacidad de unirse específicamente a un dominio Fc mutado de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico, y serán capaces de inducir la eliminación/lisis de células diana por medio de interacción con un anticuerpo terapéutico que comprende el dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo terapéutico se puede unir a un antígeno específico de tumor que se encuentra de forma natural (que se expresa de forma endógena) sobre la superficie de una célula tumoral. La unión del dominio extracelular del receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento activa ese linfocito T y la pone en contacto físico con la célula tumoral a través del anticuerpo terapéutico que comprende el dominio Fc mutado. Los linfocitos T no transducidos o endógenos (por ejemplo, linfocitos T CD8+) no se pueden unir al dominio Fc mutado del anticuerpo terapéutico que comprende el dominio Fc mutado. Los linfocitos T transducidos que expresan el receptor de unión a antígeno que comprende el dominio extracelular que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado no se ven afectados por un anticuerpo terapéutico que no comprende las mutaciones en el dominio Fc como se describen en el presente documento. En consecuencia, los linfocitos T que expresan la molécula de receptor de unión a antígeno según la invención tienen la capacidad de lisar las células diana en presencia de un anticuerpo que comprende las mutaciones en el dominio Fc como se describen en el presente documento *in vivo* y/o *in vitro*. Las células diana correspondientes comprenden células que expresan una molécula de superficie, es decir, un antígeno específico de tumor que se encuentra de forma natural sobre la superficie de una célula tumoral, que es reconocida por al menos uno, preferentemente dos, dominios de unión del anticuerpo terapéutico como se describen en el presente documento. A continuación en el presente documento se caracterizan dichas moléculas de superficie.

La lisis de la célula diana se puede detectar mediante procedimientos conocidos en la técnica. En consecuencia, dichos procedimientos comprenden, entre otros, ensayos fisiológicos *in vitro*. Dichos ensayos fisiológicos pueden monitorizar la muerte celular, por ejemplo, por pérdida de integridad de la membrana celular (por ejemplo, ensayo con yoduro de propidio basado en FACS, ensayo de entrada de azul tripano, ensayos fotométricos de liberación de enzimas (LDH), ensayo radiométrico de liberación de ⁵¹Cr, ensayos fluorométricos de liberación de europio y liberación de CalceinAM). Otros ensayos incluyen monitorizar la viabilidad celular, por ejemplo, mediante ensayos fotométricos MTT, XTT, WST-1 y alamarBlue, ensayo radiométrico de incorporación de ³H-Thd, ensayo clonogénico que mide la actividad de división celular y ensayo fluorométrico de rodamina 123 que mide el gradiente transmembranario mitocondrial. Además, se puede monitorizar la apoptosis, por ejemplo, mediante un ensayo de exposición a fosfatidilserina basado en FACS, una prueba TUNEL basada en ELISA, un ensayo de actividad caspasa (fotométrico, fluorométrico o basado en ELISA) o analizando la morfología celular modificada (encogimiento, vesiculación de la membrana).

Linfocitos T transducidos que pueden expresar receptores de unión a antígeno de la presente divulgación

Otro aspecto de la presente divulgación son linfocitos T transducidos que pueden expresar un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación. Los receptores de unión a antígeno como se describen en el presente documento se refieren a moléculas que no están comprendidas en y/o sobre la superficie de los linfocitos T de forma natural y que no se expresan (de forma endógena) en o sobre linfocitos T normales (no transducidos). Por tanto, el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación en y/o sobre los linfocitos T se introduce artificialmente en los linfocitos T. En el contexto de la presente divulgación, dichos linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+, se pueden aislar/obtener de un sujeto al que se va a tratar como se define en el presente documento. En consecuencia, los receptores de unión a antígeno como se describen en el presente documento que se introducen artificialmente y posteriormente se presentan en y/o sobre la superficie de dichos linfocitos T comprenden dominios que comprenden uno o más restos de unión a antígeno accesibles (*in vitro* o *in vivo*) a inmunoglobulinas (derivadas de Ig), preferentemente anticuerpos, en particular al dominio Fc de los anticuerpos. En el contexto de la presente divulgación, estas moléculas introducidas artificialmente se presentan en y/o sobre la superficie de dichos linfocitos T después de la transducción (retrovírica o lentivírica) como se describe a continuación en el presente documento. En consecuencia, después de la transducción, los linfocitos T de acuerdo con la presente divulgación se pueden activar por inmunoglobulinas, preferentemente anticuerpos (terapéuticos) que comprenden mutaciones específicas en el dominio Fc, como se describe en el presente documento.

La presente divulgación también se refiere a linfocitos T transducidos que expresan un receptor de unión a antígeno codificado por (una) molécula(s) de ácido nucleico que codifica(n) el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación. En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, la célula transducida puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación o un vector de la presente divulgación que expresa un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación.

En el contexto de la presente divulgación, el término "linfocito T transducido" se refiere a un linfocito T genéticamente modificado (es decir, un linfocito T en el que se ha introducido deliberadamente una molécula de ácido nucleico). El linfocito T transducido proporcionado en el presente documento puede comprender el vector de la presente divulgación. Preferentemente, el linfocito T transducido proporcionado en el presente documento comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación y/o el vector de la presente divulgación. El linfocito T transducido de la presente divulgación puede ser un linfocito T que expresa de forma transitoria o estable el ADN exógeno (es decir, la molécula de ácido nucleico que se ha introducido en el linfocito T). En particular, la molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación se puede integrar de forma estable en el genoma del linfocito T usando una transducción retrovírica o lentivírica. Usando transfección de ARNm, se puede expresar transitoriamente la molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación. Preferentemente, el linfocito T transducido proporcionado en el presente documento se ha modificado genéticamente introduciendo una molécula de ácido nucleico en el linfocito T por medio de un vector vírico (por ejemplo, un vector retrovírico o un vector lentivírico). En consecuencia, la expresión de los receptores de unión a antígeno puede ser constituyente y el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno puede ser detectable sobre la superficie celular. Este dominio extracelular del receptor de unión a antígeno puede comprender el dominio extracelular completo de un receptor de unión a antígeno como se define en el presente documento, pero también partes del mismo. El tamaño mínimo requerido es el sitio de unión a antígeno del resto de unión a antígeno en el receptor de unión a antígeno.

La expresión también puede ser secundaria o inducible en el caso de que el receptor de unión a antígeno se introduzca en los linfocitos T bajo el control de un promotor inducible o reprimible. Ejemplos de dichos promotores inducibles o reprimibles pueden ser un sistema transcripcional que contenga el promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa I (alcA) y la proteína transactivadora AlcR. Se usan diferentes formulaciones a base de alcohol agrícola para controlar la expresión de un gen de interés enlazado al promotor de alcA. Además, los sistemas promotores sensibles a la tetraciclina pueden funcionar para activar o bien reprimir el sistema de expresión génica en presencia de tetraciclina. Algunos de los elementos de los sistemas incluyen una proteína represora de tetraciclina (TetR), una secuencia operadora de tetraciclina (tetO) y una proteína de fusión transactivadora de

tetraciclina (tTA), que es la fusión de TetR y una secuencia de activación de la proteína 16 del virus del herpes simple (VP16). Además, se pueden usar promotores sensibles a esteroides, promotores relacionados con proteínas reguladas por metales o relacionadas con la patogenicidad (PR).

La expresión puede ser constitutiva o inespecífica, dependiendo del sistema usado. Los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación se pueden expresar sobre la superficie del linfocito T transducido proporcionado en el presente documento. La porción extracelular del receptor de unión a antígeno (es decir, el dominio extracelular del receptor de unión a antígeno) se puede detectar sobre la superficie celular, mientras que la porción intracelular (es decir, el(los) dominio(s) de señalización coestimulante y el dominio de señalización estimulante) no son detectables sobre la superficie celular. La detección del dominio extracelular del receptor de unión a antígeno se puede llevar a cabo usando un anticuerpo que se une específicamente a este dominio extracelular o mediante el dominio Fc mutado al que se puede unir el dominio extracelular. Se puede detectar el dominio extracelular usando estos anticuerpos o dominios Fc mediante citometría de flujo o microscopía.

Las células transducidas de la presente divulgación pueden ser cualquier célula inmunitaria. Estas incluyen, entre otras, linfocitos B, linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T citolíticos naturales (NK), linfocitos T $\gamma\delta$, células linfoides innatas, macrófagos, monocitos, células dendríticas o neutrófilos. Preferentemente dicha célula inmunitaria sería un linfocito, preferentemente un linfocito NK o linfocito T. Dichos linfocitos T incluyen linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8. La activación del receptor de unión a antígeno de la presente divulgación sobre la superficie del leucocito hará que la célula se vuelva citotóxica contra una célula diana junto con un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, independientemente del linaje del que se originó la célula. La citotoxicidad aparecerá independientemente del dominio de señalización estimulante o dominio de señalización coestimulante elegido para el receptor de unión a antígeno y no depende del suministro exógeno de citocinas adicionales. En consecuencia, la célula transducida de la presente divulgación puede ser, por ejemplo, un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+, un linfocito T $\gamma\delta$, un linfocito T citolítico natural (NK), un linfocito citolítico natural (NK), una célula linfocítica infiltrante de tumores (TIL), una célula mielóide o una célula madre mesenquimal. Preferentemente, la célula transducida proporcionada en el presente documento es un linfocito T (por ejemplo, un linfocito T autólogo), más preferentemente, la célula transducida es un linfocito T CD8+. En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, la célula transducida es un linfocito T CD8+. Además, en el contexto de la presente divulgación, la célula transducida es un linfocito T autólogo. En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, la célula transducida es, preferentemente, un linfocito T CD8+ autólogo. Además del uso de células autólogas (por ejemplo, linfocitos T) aisladas del sujeto, la presente divulgación también comprende el uso de células alogénicas. En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, la célula transducida también puede ser una célula alogénica, tal como un linfocito T CD8+ alogénico. El uso de células alogénicas se basa en el hecho de que las células, preferentemente linfocitos T, pueden reconocer un epítipo de antígeno específico presentado por células presentadoras de antígeno (APC) exógenas, siempre que las APC expresen la molécula MHC, clase I o clase II, a la que está restringida la población de células sensibles específicas, es decir, la población de linfocitos T, junto con el epítipo de antígeno reconocido por los linfocitos T. Por tanto, el término "alogénico" se refiere a células procedentes de un individuo/sujeto donante no relacionado que es compatible en antígenos leucocitarios humanos (HLA) con el individuo/sujeto al que se tratará, por ejemplo, mediante la célula transducida que expresa el receptor de unión a antígeno descrito en el presente documento. Células autólogas se refiere a células que se aíslan/obtienen como se describen anteriormente en el presente documento del sujeto al que se va a tratar con la célula transducida descrita en el presente documento.

La célula transducida de la presente divulgación se puede cotransducir con otras moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, con una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de linfocitos T.

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

En el contexto de la presente divulgación, la célula transducida de la presente divulgación se produce, preferentemente, mediante el siguiente procedimiento: las células (por ejemplo, linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+) se aíslan/obtienen de un sujeto (preferentemente un paciente humano). Los procedimientos para aislar/obtener células (por ejemplo, linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+) de pacientes o de donantes son bien conocidos en la técnica y, en el contexto de la presente, las células (por ejemplo, linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+) de pacientes o de donantes se pueden aislar mediante extracción de sangre o extracción de médula ósea. Después de aislar/obtener células como una muestra del paciente, las células (por ejemplo, linfocitos T) se separan de los demás componentes de la muestra. Se conocen varios procedimientos para separar células (por ejemplo, linfocitos T) de la muestra e incluyen, sin limitarse a, por ejemplo, leucocitaféresis para obtener células de la muestra de sangre periférica de un paciente o de un donante, aislar/obtener células usando un aparato FACSsort, separar células vivas de células muertas en muestras de biopsias en fresco que albergan células vivas a mano o usando un micromanipulador (véase, por ejemplo, Dudley, Immunother. 26 (2003), 332-342; Robbins, Clin. Oncol. 29 (2011), 917-924 o Leisegang, J. Mol. Med. 86 (2008), 573-58). Posteriormente,

se cultivan y expanden los linfocitos T aislados/obtenidos, preferentemente linfocitos T CD8+, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-CD3, usando anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 y/o usando un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 e interleucina-2 (IL-2) (véase, por ejemplo, Dudley, *Immunother.* 26 (2003), 332-342 o Dudley, *Clin. Oncol.* 26 (2008), 5233-5239).

En una etapa posterior, se modifican/transducen artificialmente/genéticamente las células (por ejemplo, linfocitos T) mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Lemoine, *J Gene Med* 6 (2004), 374-386). Los procedimientos para transducir células (por ejemplo, linfocitos T) son conocidos en la técnica e incluyen, sin estar limitados a, en un caso en el que se transduce un ácido nucleico o un ácido nucleico recombinante, por ejemplo, un procedimiento de electroporación, un procedimiento con fosfato de calcio, un procedimiento con lípidos catiónicos o un procedimiento con liposomas. El ácido nucleico que se va a transducir se puede transducir de forma convencional y altamente eficaz usando un reactivo de transfección disponible comercialmente, por ejemplo, Lipofectamina (fabricada por Invitrogen, n.º de catálogo: 11668027). En un caso en el que se usa un vector, el vector se puede transducir de la misma manera que el ácido nucleico mencionado anteriormente, siempre que el vector sea un vector plasmídico (es decir, un vector que no sea un vector vírico). En el contexto de la presente divulgación, los procedimientos para transducir células (por ejemplo, linfocitos T) incluyen la transducción de linfocitos T retrovíricos o lentivíricos, vectores no víricos (por ejemplo, vector minicircular basado en el transposón *Sleeping Beauty*.) así como transfección de ARNm. "Transfección de ARNm" se refiere a un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica para expresar de forma transitoria una proteína de interés, como en el presente caso es el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación, en una célula que se va a transducir. En resumen, las células se pueden someter a electroporación con el ARNm que codifica el receptor de unión a antígeno del presente documento usando un sistema de electroporación (tal como, por ejemplo, Gene Pulser, Bio-Rad) y, después de esto, cultivarse mediante un protocolo estándar de cultivo de células (por ejemplo, linfocitos T) como se describe anteriormente (véase Zhao *et al.*, *Mol Ther.* 13(1) (2006), 151-159). La célula transducida de la presente divulgación es un linfocito T, más preferentemente un linfocito T CD8+, y se genera mediante transducción de linfocitos T lentivíricos o, más preferentemente, retrovíricos.

En este contexto, son conocidos en la técnica vectores retrovíricos adecuados para la transducción de linfocitos T, tales como SAMEN CMV/SRa (Clay *et al.*, *J. Immunol.* 163 (1999), 507-513), LZRS-id3-IHRES (Heemskerk *et al.*, *J. Exp. Med.* 186 (1997), 1597-1602), FeLV (Neil *et al.*, *Nature* 308 (1984), 814-820), SAX (Kantoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986), 6563-6567), pDOL (Desiderio, *J. Exp. Med.* 167 (1988), 372-388), N2 (Kasid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 473-477), LNL6 (Tiberghien *et al.*, *Blood* 84 (1994), 1333-1341), pZipNEO (Chen *et al.*, *J. Immunol.* 153 (1994), 3630-3638), LASN (Mullen *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996), 1123-1129), pG1XsNa (Taylor *et al.*, *J. Exp. Med.* 184 (1996), 2031-2036), LCNX (Sun *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 8 (1997), 1041-1048), SFG (Gallardo *et al.*, *Blood* 90 (1997), 1041-1048), and LXSN (Sun *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 8 (1997), 1041-1048), SFG (Gallardo *et al.*, *Blood* 90 (1997), 952-957), HMB-Hb-Hu (Vieillard *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 11595-11600), pMV7 (Cochlovius *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 46 (1998), 61-66), pSTITCH (Weitjens *et al.*, *Gene Ther* 5 (1998), 1195-1203), pLZR (Yang *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999), 123-132), pBAG (Wu *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999), 977-982), rKat.43.267bn (Gilham *et al.*, *J. Immunother.* 25 (2002), 139-151), pLGSN (Engels *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 14 (2003), 1155-1168), pMP71 (Engels *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 14 (2003), 1155-1168), pGCSAM (Morgan *et al.*, *J. Immunol.* 171 (2003), 3287-3295), pMSGV (Zhao *et al.*, *J. Immunol.* 174 (2005), 4415-4423), o PMX (de Witte *et al.*, *J. Immunol.* 181 (2008), 5128-5136). En el contexto de la presente divulgación, los vectores lentivíricos adecuados para transducir células (por ejemplo, linfocitos T) son, por ejemplo, el vector lentivírico PL-SIN (Hotta *et al.*, *Nat Methods* 6(5) (2009), 370-376), p156RRL-sinPPT-CMV-GFP-PRE/NheI (Campeau *et al.*, *PLoS One* 4(8) (2009), e6529), pCMVR8.74 (Addgene, n.º de catálogo: 22036), FUGW (Lois *et al.*, *Science* 295(5556) (2002), 868-872), pLVX-EF1 (Addgene, n.º de catálogo: 64368), pLVE (Brunker *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(9) (2014), E798-806), pCDHI-MCSI-EFI (Hu *et al.*, *Mol Cancer Res.* 7(11) (2009), 1756-1770), pSLIK (Wang *et al.*, *Nat Cell Biol.* 16(4) (2014), 345-356), pLJM1 (Solomon *et al.*, *Nat Genet.* 45(12) (2013), 1428-30), pLX302 (Kang *et al.*, *Sci Signal.* 6(287) (2013), rs13), pHR-IG (Xie *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab.* 33(12) (2013), 1875-85), pRRLSIN (Addgene, n.º de catálogo: 62053), pLS (Miyoshi *et al.*, *J Virol.* 72(10) (1998), 8150-8157), pLL3.7 (Lazebnik *et al.*, *J Biol Chem.* 283(7) (2008), 11078-82), FRIG (Raissi *et al.*, *Mol Cell Neurosci.* 57 (2013), 23-32), pWPT (Ritz-Laser *et al.*, *Diabetologia.* 46(6) (2003), 810-821), pBOB (Marr *et al.*, *J Mol Neurosci.* 22(1-2) (2004), 5-11) o pLEX (Addgene, n.º de catálogo: 27976).

El(los) linfocito(s) T transducido(s) de la presente divulgación se cultiva(n) preferentemente en condiciones controladas, fuera de su entorno natural. En particular, el término "cultivar" significa que las células (por ejemplo, la(s) célula(s) transducida(s) de la presente divulgación) que se derivan de eucariotas multicelulares (preferentemente de un paciente humano) se cultivan *in vitro*. El cultivo de células es una técnica de laboratorio que consiste en mantener vivas células que se han separado de su fuente de tejido original. En el presente documento, la célula transducida de la presente divulgación se cultiva en condiciones que permiten la expresión del receptor de unión a antígeno de la presente divulgación en o sobre dichas células transducidas. Las condiciones que permiten la expresión de un transgén (es decir, del receptor de unión a antígeno de la presente divulgación) son comúnmente conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28 y la adición de citocinas tales como interleucina 2 (IL-2), interleucina 7 (IL-7), interleucina 12 (IL-12) y/o interleucina 15 (IL-15). Después de la expresión del receptor de unión a antígeno de la presente divulgación en la célula transducida cultivada (por ejemplo, un linfocito T CD8+), se recupera (es decir, se vuelve a extraer) la célula

transducida del cultivo (es decir, del medio de cultivo).

En consecuencia, la presente divulgación también engloba una célula transducida, preferentemente un linfocito T, en particular un linfocito T CD8+, que expresa un receptor de unión a antígeno codificado por una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación obtenible mediante el procedimiento de la presente divulgación.

Moléculas de ácido nucleico

Otro aspecto de la presente divulgación son ácidos nucleicos y vectores que codifican uno o varios receptores de unión a antígeno de la presente divulgación. Las moléculas de ácido nucleico ejemplares que codifican los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación se muestran en las SEQ ID NO: 19, 30, 35, 38, 44, 47, 51 y 52. Las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación pueden estar bajo el control de secuencias reguladoras. Por ejemplo, se pueden emplear promotores, potenciadores transcripcionales y/o secuencias que permitan la expresión inducida del receptor de unión a antígeno de la divulgación. En el contexto de la presente divulgación, las moléculas de ácido nucleico se expresan bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. Los promotores adecuados son, por ejemplo, el promotor CMV (Qin *et al.*, PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor UBC (Qin *et al.*, PLoS One 5(5) (2010), e10611), PGK (Qin *et al.*, PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor EF1A (Qin *et al.*, PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor CAGG (Qin *et al.*, PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor SV40 (Qin *et al.*, PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor COPIA (Qin *et al.*, PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor ACT5C (Qin *et al.*, PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor TRE (Qin *et al.*, PLoS One 5(5) (2010), e10611), el promotor Oct3/4 (Chang *et al.*, Molecular Therapy 9 (2004), S367-S367 (doi: 10.1016/j.ymthe.2004.06.904)) o el promotor Nanog (Wu *et al.*, Cell Res. 15(5) (2005), 317-24). Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a (un) vector(es) que comprende(n) la(s) molécula(s) de ácido nucleico descrita(s) en la presente divulgación. En el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico circular o lineal que se puede replicar de forma autónoma en una célula huésped (es decir, en una célula transducida) en la que se ha introducido. Los expertos en biología molecular conocen muchos vectores adecuados, cuya elección dependerá de la función deseada e incluirá plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores usados convencionalmente en genomanipulación. Se pueden usar procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir diversos plásmidos y vectores; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.* (*loc. cit.*) y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), (1994). De forma alternativa, los polinucleótidos y vectores de la presente divulgación se pueden reconstituir en liposomas para su administración a células diana. Como se analiza con más detalle a continuación, se usó un vector de clonación para aislar secuencias individuales de ADN. Las secuencias relevantes se pueden transferir a vectores de expresión en los que se requiera la expresión de un polipéptido particular. Los vectores de clonación típicos incluyen pBluescript SK, pGEM, pUC9, pBR322, pGA18 y pGBT9. Los vectores de expresión típicos incluyen pTRE, pCAL-n-EK, pESP-1, pOP13CAT.

La presente divulgación también se refiere a (un) vector(es) que comprende(n) (una) molécula(s) de ácido nucleico que es(son) una secuencia reguladora enlazado(s) de forma funcional a dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico que codifica(n) un receptor de unión a antígeno como se define en el presente documento. En el contexto de la presente divulgación, el vector puede ser policistrónico. Dichas secuencias reguladoras (elementos de control) son conocidas para el experto en la técnica y pueden incluir un promotor, un casete de empalme, un codón de inicio de la traducción y un sitio de traducción e inserción para introducir un inserto en el(los) vector(es). En el contexto de la presente divulgación, dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico se enlaza(n) de forma funcional a dichas secuencias de control de expresión, permitiendo la expresión en células eucariotas o procariotas. Se prevé que dicho(s) vector(es) sea(n) (un) vector(es) de expresión que comprende(n) la(s) molécula(s) de ácido nucleico que codifica(n) el receptor de unión a antígeno como se define en el presente documento. "Enlazado de forma funcional" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Una secuencia de control enlazada de forma funcional a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control. En caso de que la secuencia de control sea un promotor, es obvio para un experto en la técnica que se usa preferentemente un ácido nucleico bicatenario.

En el contexto de la presente divulgación, el(los) vector(es) citado(s) es(son) (un) vector(es) de expresión. Un vector de expresión es una construcción que se puede usar para transformar una célula seleccionada y permite la expresión de una secuencia codificante en la célula seleccionada. (Un) vector(es) de expresión puede(n) ser, por ejemplo, (un) vector(es) de clonación, (un) vector(es) binario(s) o (un) vector(es) de integración. La expresión comprende la transcripción de la molécula de ácido nucleico, preferentemente en un ARNm traducible. Los elementos reguladores que garantizan la expresión en células procariotas y/o eucariotas son bien conocidos por los expertos en la técnica. En el caso de las células eucariotas, normalmente comprenden promotores que garantizan el inicio de la transcripción y, opcionalmente, señales poli-A que garantizan la finalización de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procariotas comprenden, por ejemplo, el promotor PL, lac, trp o tac en *E. coli*, y ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor CMV, SV40, RSV (virus del sarcoma de Rous), el potenciador CMV, el potenciador SV40 o un intrón de globina en células de mamíferos y de otros animales.

Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción, dichos elementos reguladores también pueden comprender señales de finalización de la transcripción, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, corriente abajo del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, a la secuencia codificante de la secuencia de ácido nucleico citada se le pueden añadir secuencias líderes que codifiquen péptidos señal que puedan dirigir el polipéptido hacia un compartimento celular o secretarlo al medio, y son bien conocidas en la técnica; véanse también, por ejemplo, los ejemplos adjuntos.

La(s) secuencia(s) líder(es) se ensambla(n) en la fase apropiada con secuencias de traducción, iniciación y finalización, y, preferentemente, una secuencia líder que pueda dirigir la secreción de la proteína traducida, o una porción de la misma, hacia el espacio periplásmico o el medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar un receptor de unión a antígeno que incluye un péptido de identificación N terminal que imparte características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado; véase *supra*. En este contexto, vectores de expresión adecuados son conocidos en la técnica, tales como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pEF-DHFR, pEF-ADA o pEF-neo (Raum *et al.* Cancer Immunol Immunother 50 (2001), 141-150) o pSPORT1 (GIBCO BRL).

En el contexto de la presente divulgación, las secuencias de control de expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores que pueden transformar o transfectar células eucariotas, pero también se pueden usar secuencias de control para células procariotas. Una vez que el vector se ha incorporado a la célula apropiada, la célula se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión a alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y como se desee. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores tanto transcripcionales, así como traduccionales. De forma ventajosa, los vectores descritos anteriormente de la presente divulgación comprenden un marcador seleccionable y/o puntuable. Los genes marcadores seleccionables útiles para la selección de células transformadas y, por ejemplo, tejido vegetal y plantas son bien conocidos por los expertos en la técnica y comprenden, por ejemplo, resistencia a antimetabolitos como base de la selección para dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994), 143-149), npt, que confiere resistencia a los aminoglucósidos neomicina, kanamicina y paromicina (Herrera-Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987-995) e hyg, que confiere resistencia a higromicina (Marsh, Gene 32 (1984), 481-485). Se han descrito genes seleccionables adicionales, a saber, trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047); manosa-6-fosfato isomerasa que las células utilicen manosa (documento WO 94/20627) y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, 1987, rn: (Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) o desaminasa de *Aspergillus terreus* que confiere resistencia a Blastidina S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336-2338).

Los marcadores puntuables útiles también son conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente. De forma ventajosa, dicho marcador es un gen que codifica luciferasa (Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59-72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121), proteína verde fluorescente (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47) o β -glucuronidasa (Jefferson, EMBO J. 6 (1987), 3901-3907). Este modo de realización es en particular útil para el cribado simple y rápida de células, tejidos y organismos que contienen un vector citado.

Como se describe anteriormente, la(s) molécula(s) de ácido nucleico citadas se pueden usar solas o como parte de (un) vector(es) para expresar los receptores de unión a antígeno de la presente divulgación en células, por ejemplo, para tratamiento adoptivo con linfocitos T, pero también para fines de tratamiento génico. Las moléculas de ácido nucleico o vector(es) que contienen la(s) secuencia(s) de ADN que codifica(n) cualquiera de los receptores de unión a antígeno descritos en el presente documento se introducen en las células, que a su vez producen el polipéptido de interés. El tratamiento génico, que se basa en la introducción de genes terapéuticos en las células mediante técnicas *ex vivo* o *in vivo*, es una de las aplicaciones más importantes de la transferencia génica. Los vectores, procedimientos o sistemas de administración de genes adecuados para procedimientos o sistemas de administración de genes para tratamiento génico *in vitro* o *in vivo* se describen en la literatura y son conocidos por los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91 (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci. 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; documento WO 94/29469; documento WO 97/00957; documento US 5.580.859; documento US 5.589.466; o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640. La(s) molécula(s) de ácido nucleico y el(los) vector(es) citados se pueden diseñar para introducción directa o para introducción por medio de liposomas, o vectores víricos (por ejemplo, adenovíricos, retrovíricos) en la célula. En el contexto de la presente divulgación, dicha célula es un linfocito T, tal como linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD3+, linfocitos $\gamma\delta$ o linfocitos T citolíticos naturales (NK), preferentemente linfocitos T CD8+.

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación proporciona procedimientos para derivar vectores, en particular plásmidos, cósmidos y bacteriófagos usados convencionalmente en genomanipulación que comprenden una

molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia polipeptídica de un receptor de unión a antígeno definido en el presente documento. En el contexto de la presente divulgación, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia o focalización de genes. Se pueden usar vectores de expresión derivados de virus, tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adenoasociados, virus del herpes o virus del papiloma bovino, para administrar los polinucleótidos o vectores citados a poblaciones de células seleccionadas.

Se pueden usar procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir (un) vector(es) recombinante(s); véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.* (*loc. cit.*), Ausubel (1989, *loc. cit.*) u otros libros de texto estándar. De forma alternativa, las moléculas de ácido nucleico y los vectores citados se pueden reconstituir en liposomas para su administración a células diana. Los vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación se pueden transferir a la célula huésped mediante procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden usar para otros huéspedes celulares; véase Sambrook, *supra*. El vector citado puede ser, entre otros, pEF-DHFR, pEF-ADA o pEF-neo. Los vectores pEF-DHFR, pEF-ADA y pEF-neo se han descrito en la técnica, por ejemplo, en Mack *et al.* Proc. Natl. Sci. USA 92 (1995), 7021-7025 y Raum *et al.* Cancer Immunol Immunother 50 (2001), 141-150.

La presente divulgación también proporciona un linfocito T transformado o transfectado con un vector como se describe en el presente documento. Dicho linfocito T se puede producir introduciendo al menos uno de los vectores descritos anteriormente o al menos una de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente en el linfocito T o su célula precursora. La presencia de dicho al menos un vector o al menos una molécula de ácido nucleico en el linfocito T puede mediar la expresión de un gen que codifica el receptor de unión a antígeno descrito anteriormente que comprende un dominio extracelular que comprende un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un dominio Fc mutado. El vector de la presente divulgación puede ser policistónico.

La(s) molécula(s) de ácido nucleico o vector(es) descrito(s) que se introduce(n) en el linfocito T o su célula precursora se pueden integrar en el genoma de la célula o bien se pueden mantener extracromosómicamente.

Antígenos específicos de tumor

Como se menciona anteriormente, el(los) dominio(s) (derivado(s) de Ig) del anticuerpo descrito en el presente documento que comprende un dominio Fc mutado puede(n) comprender un sitio de interacción con el antígeno con especificidad por una molécula de superficie celular, es decir, un antígeno específico de tumor que se encuentra de forma natural sobre la superficie de una célula tumoral. En el contexto de la presente divulgación, dichos anticuerpos pondrán los linfocitos T transducidos como se describen en el presente documento que comprenden el receptor de unión a antígeno de la presente divulgación en contacto físico con una célula tumoral, en la que el linfocito T transducido se activa. La activación de los linfocitos T transducidos de la presente divulgación puede dar como resultado la lisis de la célula tumoral como se describe en el presente documento.

A continuación en el presente documento se proporcionan ejemplos de marcadores tumorales que se encuentran de forma natural sobre la superficie de las células tumorales y que comprenden, pero no se limitan a, FAP (proteína de activación de fibroblastos), CEA (antígeno carcinoembrionario), p95 (p95HER2), BCMA (antígeno de maduración de linfocitos B), EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales), MSLN (mesotelina), MCSP (proteoglicano de sulfato de condroitina de melanoma), HER-1 (factor de crecimiento epidérmico humano 1), HER-2 (factor de crecimiento epidérmico humano 2), HER-3 (factor de crecimiento epidérmico humano 3), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, receptor de folato 1 (FOLR1), antígeno de superficie celular de trofoblasto humano 2 (Trop-2), antígeno de cáncer 12-5 (CA-12-5), antígeno leucocitario humano relacionado con antígeno D (HLA-DR), MUC-1 (mucina 1), antígeno A33, PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), tirosina cinasa 3 similar a FMS (FLT-3), PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), PSCA (antígeno de células madre de la próstata), receptor de transferrina, TNC (tenascina), anhidrasa carbónica IX (CA-IX) y/o péptidos unidos a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano.

En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, el receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento se une al dominio Fc mutado de un anticuerpo, es decir, un anticuerpo terapéutico que se puede unir específicamente a un antígeno/marcador que se encuentra de forma natural sobre la superficie de las células tumorales seleccionadas del grupo que consiste en FAP (proteína de activación de fibroblastos), CEA (antígeno carcinoembrionario), p95 (p95HER2), BCMA (antígeno de maduración de linfocitos B), EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales), MSLN (mesotelina), MCSP (proteoglicano de sulfato de condroitina de melanoma), HER-1 (factor de crecimiento epidérmico humano 1), HER-2 (factor de crecimiento epidérmico humano 2), HER-3 (factor de crecimiento epidérmico humano 3), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, receptor de folato 1 (FOLR1), antígeno de superficie celular de trofoblasto humano 2 (Trop-2), antígeno de cáncer 12-5 (CA-12-5), antígeno leucocitario humano relacionado con antígeno D (HLA-DR), MUC-1 (mucina 1), antígeno A33, PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), tirosina cinasa 3 similar a FMS (FLT-3), PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), PSCA (antígeno de células madre de la próstata), receptor de transferrina, TNC (tenascina), anhidrasa carbónica IX (CA-IX) y/o péptidos unidos a una molécula del complejo principal de

histocompatibilidad (MHC) humano.

La(s) secuencia(s) de los miembros (humanos) del antígeno A33, BCMA (antígeno de maduración de linfocitos B), antígeno de cáncer 12-5 (CA-12-5), anhidrasa carbónica IX (CA-IX), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CEA (antígeno carcinoembrionario), EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales), FAP (proteína de activación de fibroblastos), tirosina cinasa 3 similar a FMS (FLT-3), receptor de folato 1 (FOLR1), HER-1 (factor de crecimiento epidérmico humano 1), HER-2 (factor de crecimiento epidérmico humano 2), HER-3 (factor de crecimiento epidérmico humano 3), antígeno leucocitario humano relacionado con antígeno D (HLA-DR), MSLN (mesotelina), MCSP (proteoglucano de sulfato de condroitina de melanoma), MUC-1 (mucina 1), PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), PSCA (antígeno de células madre de la próstata), p95 (p95HER2), receptor de transferrina, TNC (tenascina), antígeno de superficie celular de trofoblasto humano 2 (Trop-2) está(n) disponible(s) en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot y se pueden recuperar en <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed%3Ayes>. Estas secuencias (de proteínas) también se refieren a secuencias modificadas anotadas. La presente divulgación también proporciona técnicas y procedimientos en los que se usan secuencias homólogas y también variantes génicas alélicas y similares de las secuencias concisas proporcionadas en el presente documento. En el presente documento se usan preferentemente dichas variantes y similares de las secuencias concisas. Preferentemente, dichas variantes son variantes génicas. El experto en la técnica puede deducir fácilmente la región codificante relevante de estas secuencias (de proteínas) en estas entradas del banco de datos, que también puede comprender la entrada de ADN genómico, así como de ARNm/ADNc. La(s) secuencia(s) de la FAP (proteína de activación de fibroblastos) (humana) se pueden obtener de la entrada Q12884 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 168, versión de secuencia 5); la(s) secuencia(s) del CEA (antígeno carcinoembrionario) (humano) se puede(n) obtener de la entrada P06731 la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 171, versión de secuencia 3); la(s) secuencia(s) de la EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales) (humana) se puede(n) obtener de la entrada P16422 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 117, versión de secuencia 2); la(s) secuencia(s) de la MSLN (mesotelina) (humana) se puede(n) obtener de la entrada número Q13421 de UniProt (número de versión 132; versión de secuencia 2); la(s) secuencia(s) de la tirosina cinasa 3 similar a FMS (humana) (FLT-3) se puede(n) obtener de la entrada P36888 (número de acceso citable principal) o Q13414 (número de acceso secundario) de la base de datos Swiss-Prot con el número de versión 165 y la versión de secuencia 2; las secuencias de MCSP (humano) (proteoglucano de sulfato de condroitina de melanoma) se pueden obtener de la entrada número Q6UVK1 de UniProt (número de versión 118; versión de secuencia 2); la(s) secuencia(s) del receptor de folato 1 (FOLR1) (humano) se puede(n) obtener de la entrada número P15328 (número de acceso citable principal) o Q53EW2 (número de acceso secundario) de UniProt con el número de versión 153 y la versión de secuencia 3; la(s) secuencia(s) del antígeno de superficie celular de trofoblasto 2 (Trop-2) (humano) se puede(n) obtener de la entrada número P09758 (número de acceso citable principal) o Q15658 (número de acceso secundario) de UniProt con el número de versión 172 y la versión de secuencia 3; la(s) secuencia(s) del PSCA (antígeno de células madre de la próstata) (humano) se puede(n) obtener de la entrada número 043653 (número de acceso citable principal) o Q6UW92 (número de acceso secundario) de UniProt con el número de versión 134 y la versión de secuencia 1; la(s) secuencia(s) del ITER-1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico) (humano) se puede(n) obtener de la entrada P00533 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 177, versión de secuencia 2); la(s) secuencia(s) del HER-2 (receptor de la proteína tirosina cinasa erbB-2) (humano) se puede(n) obtener de la entrada P04626 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 161, versión de secuencia 1); la(s) secuencia(s) del HER-3 (receptor de la proteína tirosina cinasa erbB-3) (humano) se puede(n) obtener de la entrada P21860 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 140, versión de secuencia 1); la(s) secuencia(s) del CD20 (antígeno de linfocitos B CD20) (humano) se puede(n) obtener de la entrada P11836 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 117, versión de secuencia 1); la(s) secuencia(s) del CD22 (antígeno de linfocitos B CD22) (humano) se puede(n) obtener de la entrada P20273 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 135, versión de secuencia 2); la(s) secuencia(s) del CD33 (antígeno de linfocitos B CD33) (humano) se puede(n) obtener de la entrada P20138 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 129, versión de secuencia 2); la(s) secuencia(s) de la CA-12-5 (mucina 16) (humana) se puede(n) obtener de la entrada Q8WXI7 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 66, versión de secuencia 2); la(s) secuencia(s) del HLA-DR (humano) se puede(n) obtener de la entrada Q29900 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 59, versión de secuencia 1); la(s) secuencia(s) de la MUC-1 (mucina-1) (humana) se puede(n) obtener de la entrada P15941 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 135, versión de secuencia 3); la(s) secuencia(s) del A33 (antígeno de superficie celular A33) (humano) se puede(n) obtener de la entrada Q99795 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 104, versión de secuencia 1); la(s) secuencia(s) del PSMA (glutamato carboxipeptidasa 2) (humano) se puede(n) obtener de la entrada Q04609 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 133, versión de secuencia 1); la(s) secuencia(s) del receptor de transferrina (humano) se puede(n) obtener de las entradas Q9UP52 (versión de entrada 99, versión de secuencia 1) y P02786 (versión de entrada 152, versión de secuencia 2) de la base de datos Swiss-Prot; la secuencia de la TNC (tenascina) (humana) se puede obtener de la entrada P24821 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 141, versión de secuencia 3); o la(s) secuencia(s) de la CA-IX (anhidrasa carbónica IX) (humana) se puede(n) obtener de la entrada Q16790 de la base de datos Swiss-Prot (versión de entrada 115, versión de secuencia 2).

Uso terapéutico y procedimientos de tratamiento

Las moléculas o construcciones (es decir, receptores de unión a antígeno, linfocitos T transducidos y kits) proporcionados en el presente documento son en particular útiles en entornos médicos, en particular para el tratamiento de una neoplasia maligna. Por ejemplo, se puede tratar un tumor con un linfocito T transducido que expresa un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación junto con un anticuerpo terapéutico específico para la célula tumoral y que comprende un dominio Fc mutado. En consecuencia, en determinados modos de realización, se usan el receptor de unión a antígeno, el linfocito T transducido o el kit en el tratamiento de una neoplasia maligna, en particular, en los que la neoplasia maligna se selecciona entre cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y cáncer hemático.

La especificidad tumoral del tratamiento es proporcionada por el anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se administra antes de, simultáneamente con o después de la administración de un linfocito T transducido que expresa un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación. En este contexto, los linfocitos T transducidos son linfocitos T universales, ya que no son específicos para un tumor determinado sino que se pueden dirigir a cualquier tumor dependiendo del anticuerpo terapéutico que comprenda el dominio Fc mutado usado de acuerdo con la presente divulgación.

En este contexto, la neoplasia maligna puede ser un cáncer/carcinoma de origen epitelial, endotelial o mesotelial o un cáncer hemático. En el contexto de la presente divulgación, el cáncer/carcinoma se selecciona del grupo que consiste en cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, cáncer bucal, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, linfoma de linfocitos B y T, leucemia mielógena, cáncer de ovarios, leucemia, leucemia linfocítica, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel (melanoma), cánceres de las vías genitourinarias, por ejemplo, cáncer de testículos, cáncer de ovarios, cáncer endotelial, cáncer de cuello uterino y cáncer de riñón, cáncer de las vías biliares, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales y cáncer de la glándula tiroides u otras enfermedades tumorales como tumores hemáticos, gliomas, sarcomas u osteosarcomas.

Por ejemplo, se pueden tratar las enfermedades tumorales y/o linfomas con una construcción específica dirigida contra estas indicaciones médicas. La indicación para un linfocito T transducido de la presente divulgación combinado con un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado viene dada por la especificidad del anticuerpo terapéutico por un antígeno tumoral. Por ejemplo, se puede tratar el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel y/o cáncer bucal con un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra EpCAM (humano) (como el antígeno específico de tumor que se encuentra de forma natural sobre la superficie de una célula tumoral).

Se puede tratar el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel y/o cáncer bucal con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra HER1, preferentemente HER1 humano. Además, se puede tratar el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, glioblastoma y/o cáncer bucal con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado en la que el anticuerpo está dirigido contra MCSP, preferentemente MCSP humano. Se puede tratar el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, glioblastoma y/o cáncer bucal con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado en la que el anticuerpo está dirigido contra FOLR1, preferentemente FOLR1 humano. Se puede tratar el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, glioblastoma y/o cáncer bucal con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado en la que el anticuerpo está dirigido contra Trop-2, preferentemente Trop-2 humano. Se puede tratar el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, glioblastoma y/o cáncer bucal con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado en la que el anticuerpo está dirigido contra PSCA, preferentemente PSCA humano. Se puede tratar el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, glioblastoma y/o cáncer bucal con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado en la que el anticuerpo está dirigido contra EGFRvIII, preferentemente EGFRvIII humano. Se puede tratar el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, glioblastoma y/o cáncer bucal con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado en la que el anticuerpo está dirigido contra MSLN, preferentemente MSLN

humano. Se puede tratar el cáncer gástrico, cáncer de mama y/o cáncer de cuello uterino con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra HER2, preferentemente HER2 humano. Se puede tratar el cáncer gástrico y/o el cáncer de pulmón con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra HER3, preferentemente HER3 humano. Se puede tratar el linfoma de linfocitos B y/o linfoma de linfocitos T con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra CD20, preferentemente CD20 humano. Se puede tratar el linfoma de linfocitos B y/o linfoma de linfocitos T con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra CD22, preferentemente CD22 humano. Se puede tratar la leucemia mielógena con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra CD33, preferentemente CD33 humano. Se puede tratar el cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer de mama y/o cáncer gastrointestinal con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra CA12-5, preferentemente CA12-5 humana.

Se puede tratar el cáncer gastrointestinal, leucemia y/o carcinoma nasofaríngeo con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra HLA-DR, preferentemente HLA-DR humano. Se puede tratar el cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón y/o cáncer de páncreas con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra MUC-1, preferentemente MUC-1 humana. Se puede tratar el cáncer de colon con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra A33, preferentemente A33 humano. Se puede tratar el cáncer de próstata con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra PSMA, preferentemente PSMA humano. Se puede tratar el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel y/o cáncer bucal con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra el receptor de transferrina, preferentemente el receptor de transferrina humano. Se puede tratar el cáncer de páncreas, cáncer de pulmón y/o cáncer de mama con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo se dirige contra el receptor de transferrina, preferentemente el receptor de transferrina humano. Se puede tratar el cáncer renal con un linfocito T transducido de la presente divulgación administrado antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio Fc mutado, en el que el anticuerpo está dirigido contra CA-IX, preferentemente CA-IX humana. En consecuencia, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad, una neoplasia maligna tal como cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y/o cáncer hemático. En el contexto de la presente divulgación, dicho sujeto es un ser humano.

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

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

En el contexto de la presente divulgación, dichos linfocitos T transducidos, preferentemente linfocitos T CD8+, y/o anticuerpo(s) terapéutico(s) se coadministran a dicho sujeto mediante infusión intravenosa.

Además, en el contexto de la presente divulgación, la presente divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad que comprende las etapas de

- (a) aislar linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+, de un sujeto;

(b) transducir dichos linfocitos T aislados, preferentemente linfocitos T CD8+, con un receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento;

(c) opcionalmente, cotransducir dichos linfocitos T aislados, preferentemente linfocitos T CD8+, con un receptor de linfocitos T;

(d) expandir los linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+, mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28; y

(e) administrar los linfocitos T transducidos, preferentemente linfocitos T CD8+, a dicho sujeto.

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

El procedimiento para el tratamiento comprende, además, la administración del anticuerpo usado de acuerdo con la presente divulgación. Dicho anticuerpo se puede administrar antes de, simultáneamente con o después de que se vayan a administrar los linfocitos T transducidos. En el contexto de la presente divulgación, la administración de los linfocitos T transducidos se realizará mediante infusión intravenosa. En el contexto de la presente divulgación, los linfocitos T transducidos se aíslan/obtienen del sujeto al que se va a tratar.

Composiciones

Además, la presente divulgación proporciona composiciones (medicamentos) que comprenden (una) molécula(s) de anticuerpo con (un) dominio(s) Fc mutado(s), (un) linfocito(s) T transducido(s) que comprende(n) un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación, (una) molécula(s) de ácido nucleico y (un) vector(es) que codifica(n) los receptores de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación, y/o kits que comprenden una o más de dichas composiciones. En el contexto de la presente divulgación, la composición es una composición farmacéutica que comprende además, opcionalmente, formulaciones adecuadas de vehículo, estabilizadores y/o excipientes. En consecuencia, en el contexto de la presente divulgación, se proporciona una composición farmacéutica (medicamento) que comprende una molécula de anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado como se define en el presente documento que se ha de administrar en combinación con un linfocito T transducido que comprende un receptor de unión a antígeno como se describe en el presente documento y/o una composición que comprende dicho linfocito T transducido, en la que dicha molécula de anticuerpo se ha de administrar antes de, simultáneamente con o después de la administración de linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación.

De acuerdo con la presente divulgación, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición para su administración a un paciente, preferentemente un paciente humano. Además, en el contexto de la presente divulgación, ese paciente padece una enfermedad, en la que la enfermedad es una neoplasia maligna, especialmente cánceres/carcinomas de origen epitelial, endotelial o mesotelial o un cáncer hemático. En el contexto de la presente divulgación, los cánceres/carcinomas se seleccionan del grupo que consiste en cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, cáncer bucal, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, linfoma de linfocitos B y T, leucemia mielógena, cáncer de ovarios, leucemia, leucemia linfocítica, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel (melanoma), cánceres de las vías genitourinarias, por ejemplo, cáncer de testículos, cáncer endotelial, cáncer de cuello uterino y cáncer de riñón, cáncer de las vías biliares, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales y cáncer de la glándula tiroides u otras enfermedades tumorales como tumores hemáticos, gliomas, sarcomas u osteosarcomas.

En un modo de realización preferente, la composición farmacéutica / medicamento comprende un anticuerpo y/o un linfocito T transducido como se define en el presente documento para administración parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intravenosa, intratecal o mediante inyección directa en el tejido o tumor. En el contexto de la presente divulgación, la composición/medicamento comprende un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado como se define en el presente documento que se ha de administrar antes de, simultáneamente con o después de la administración de linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión a antígeno como se define en el presente documento. En el contexto de la presente divulgación, la composición farmacéutica / medicamento que comprende un anticuerpo como se define en el presente documento se ha de administrar en combinación con una composición/medicamento que comprende un linfocito T transducido que comprende un receptor de unión a antígeno como se define en el presente documento, en la que dicho linfocito T se obtuvo de un sujeto al que se va a tratar.

El uso del término "en combinación" no restringe el orden en que se han de administrar los componentes de la pauta de tratamiento al sujeto. En consecuencia, la composición farmacéutica / medicamento descritos en el

presente documento engloba la administración de un anticuerpo como se define en el presente documento antes de, simultáneamente con o después de la administración de linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación. "En combinación", como se usa en el presente documento, tampoco restringe el tiempo entre la administración de un anticuerpo como se define en el presente documento anteriormente y de los linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión a antígeno como se define en el presente documento. Por tanto, cuando los dos componentes no se administren simultáneamente/concurrentemente, las administraciones se pueden separar 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas o 72 horas o cualquier diferencia de tiempo adecuada fácilmente determinada por un experto en la técnica y/o descrita en el presente documento.

En el contexto de la presente divulgación, el término "en combinación" también engloba la situación en la que se preincuban juntos el anticuerpo como se define en el presente documento y los linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación antes de la administración al sujeto. Por tanto, se pueden preincubar los dos componentes antes de la administración durante, por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos o 1 hora o durante cualquier tiempo adecuado fácilmente determinado por un experto en la técnica. La presente divulgación también proporciona una pauta de tratamiento en la que el anticuerpo como se define en el presente documento y los linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión a antígeno como se definen en el presente documento se han de administrar simultáneamente/concurrentemente. En el contexto de la presente divulgación, el anticuerpo como se define en el presente documento se puede administrar después de que se hayan administrado los linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión a antígeno.

Además, "en combinación", como se usa en el presente documento, no restringe las pautas de tratamiento divulgadas a la administración de un anticuerpo como se define en el presente documento y de linfocitos T transducidos, preferentemente linfocitos T CD8+, que comprenden un receptor de unión a antígeno de la presente divulgación en secuencia inmediata (es decir, la administración de uno de los dos componentes, seguida (después de un determinado intervalo de tiempo) por la administración del otro sin la administración y/o práctica de ningún otro protocolo de tratamiento entre ellas. Por lo tanto, las presentes pautas de tratamiento también engloban la administración separada de una molécula de anticuerpo como se define en el presente documento y de linfocitos T transducidos, preferentemente linfocitos T CD8+, que comprenden un receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación, en las que las administraciones se separan por uno o más protocolos de tratamiento necesarios y/o adecuados para el tratamiento o la prevención de la enfermedad, o de un síntoma de la misma. Los ejemplos de dichos protocolos de tratamiento intercalados incluyen, pero no se limitan a, la administración de analgésicos, la administración de quimioterápicos y el tratamiento quirúrgico de la enfermedad o de un síntoma de la misma. En consecuencia, las pautas de tratamiento como se divulgan en el presente documento engloban la administración de un anticuerpo como se define en el presente documento y de linfocitos T transducidos, preferentemente linfocitos T CD8+, que comprenden un receptor de unión a antígeno como se definen en el presente documento conjuntamente con ninguno, uno o más de un protocolo de tratamiento adecuado para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, o un síntoma de la misma, como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica.

Se prevé en particular que dicha(s) composición(es) farmacéutica(s) / medicamento(s) se administre(n) a un paciente mediante infusión o inyección. En el contexto de la presente divulgación, los linfocitos T transducidos que comprenden un receptor de unión a antígeno como se describen en el presente documento se han de administrar a un paciente mediante infusión o inyección. La administración de las composiciones/medicamentos adecuados se puede efectuar por diferentes vías: administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica.

La composición farmacéutica / medicamento de la presente divulgación puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular mediante procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto a una dosis adecuada. La pauta posológica se determinará por el médico especialista y por factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos que se estén administrando concurrentemente.

En general, la pauta como administración regular de la composición farmacéutica debe estar en el intervalo de 1 µg a 5 g unidades por día. Sin embargo, una dosificación más preferente para infusión continua podría estar en el intervalo de 0,01 µg a 2 mg, preferentemente de 0,01 µg a 1 mg, más preferentemente de 0,01 µg a 100 µg, incluso más preferentemente de 0,01 µg a 50 µg y lo más preferentemente de 0,01 µg a 10 µg unidades por kilogramo de peso corporal por hora. A continuación en el presente documento se citan las dosificaciones en particular preferentes. Se puede realizar un seguimiento del progreso mediante evaluación periódica. Las

dosificaciones variarán, pero la dosificación preferente para la administración intravenosa de ADN es de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula de ADN.

Las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar local o sistemáticamente. La administración se realizará, en general, por vía parenteral, por ejemplo, intravenosa; los linfocitos T transducidos también se pueden administrar dirigidos al sitio diana, por ejemplo, mediante un catéter en un sitio de una arteria. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la presente divulgación podría comprender vehículos proteínicos, como, por ejemplo, seroalbúmina o inmunoglobulina, preferentemente de origen humano. Se prevé que la composición farmacéutica de la presente divulgación podría comprender, además de las construcciones de anticuerpos proteínicos o moléculas de ácido nucleico o vectores que codifican los mismos (como se describe en el presente documento) y/o células, otros agentes biológicamente activos, dependiendo del uso previsto de la composición farmacéutica. Dichos agentes podrían ser fármacos que actúan sobre el sistema gastrointestinal, fármacos que actúan como citostáticos, fármacos que previenen la hiperuricemia, fármacos que inhiben las reacciones inmunitarias (por ejemplo, corticoesteroides), fármacos que actúan sobre el aparato circulatorio y/o agentes tales como moléculas coestimulantes de linfocitos T o citocinas conocidas en la técnica.

Las posibles indicaciones para la administración de la(s) composición(es) / medicamento(s) de la presente divulgación son neoplasias malignas tales como cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y cáncer hemático, especialmente cánceres/carcinomas epiteliales tales como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel (melanoma), cánceres de las vías genitourinarias, por ejemplo, cáncer de ovarios, cáncer de testículos, cáncer endotelial, cáncer de cuello uterino y cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de las vías biliares, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales y cáncer de la glándula tiroides u otras enfermedades tumorales como tumores hemáticos, gliomas, sarcomas u osteosarcomas.

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

La composición de la presente divulgación, como se describe anteriormente, también puede ser una composición diagnóstica que comprende además, opcionalmente, medios y procedimientos para detección.

En consecuencia, en modos de realización preferentes, se proporcionan el kit, los receptores de unión a antígeno o el linfocito T transducido como se describen en el presente documento para su uso como medicamento. En el contexto de la presente divulgación, se proporciona el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación para su uso como medicamento, en el que se deben administrar uno o más anticuerpos que comprenden un dominio Fc mutado como se describe en el presente documento antes de, simultáneamente con o después de la administración de linfocitos T transducidos, preferentemente linfocitos T CD8+, que comprenden y/o expresan un receptor de unión a antígeno como se definen en el presente documento y en los que dichos linfocitos T, preferentemente linfocitos T CD8+, se obtuvieron de un sujeto al que se va a tratar. Dicho medicamento se puede emplear en un procedimiento de tratamiento de neoplasias malignas, especialmente cánceres/carcinomas de origen epitelial, endotelial o mesotelial o hemáticos. En el contexto de la presente divulgación, el cáncer/carcinoma se selecciona del grupo que consiste en cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, cáncer bucal, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, linfoma de linfocitos B y T, leucemia mielógena, cáncer de ovarios, leucemia, leucemia linfocítica, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel (melanoma), cánceres de las vías genitourinarias, por ejemplo, cáncer de testículos, cáncer de ovarios, cáncer endotelial, cáncer de cuello uterino y cáncer de riñón, cáncer de las vías biliares, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales y cáncer de la glándula tiroides u otras enfermedades tumorales como tumores hemáticos, gliomas, sarcomas u osteosarcomas.

Además, en el contexto de la presente divulgación, el anticuerpo como se describe en el presente documento que comprende un dominio Fc mutado se une a un antígeno específico de tumor que se encuentra de forma natural sobre la superficie de una célula tumoral, en el que dicha molécula de anticuerpo se ha de administrar antes de, simultáneamente con o después de la administración de linfocitos T transducidos, preferentemente linfocitos T

CD8+, de dicho sujeto que comprenden un receptor de unión a antígeno como se definen en el presente documento. En el contexto de la presente divulgación, el cáncer/carcinoma se selecciona del grupo que consiste en cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, cáncer bucal, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, linfoma de linfocitos B y T, leucemia mielógena, cáncer de ovarios, leucemia, leucemia linfocítica, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel (melanoma), cánceres de las vías genitourinarias, por ejemplo, cáncer de testículos, cáncer de ovarios, cáncer endotelial, cáncer de cuello uterino y cáncer de riñón, cáncer de las vías biliares, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales y cáncer de la glándula tiroides u otras enfermedades tumorales como tumores hemáticos, gliomas, sarcomas u osteosarcomas.

Además, de acuerdo con la presente divulgación, se proporciona una molécula o construcción (es decir, una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento) que comprende uno o dos dominios de unión dirigidos a / que se unen a / que interactúan con un antígeno tumoral, preferentemente un antígeno tumoral humano, (como el antígeno específico de tumor que se encuentra de forma natural sobre la superficie de una célula tumoral) y que comprende un dominio Fc mutado, en la que los dominios extracelulares definidos en el presente documento del receptor de unión a antígeno de la presente divulgación se dirigen a / se unen a / interactúan con el dominio Fc mutado, para el tratamiento del cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel y/o cáncer bucal. Por tanto, en el contexto de la presente divulgación, se proporciona una molécula de anticuerpo que comprende dos dominios de unión dirigidos a / que se unen a / que interactúan con un antígeno tumoral, preferentemente un antígeno tumoral humano, y que comprenden un dominio Fc mutado, en la que los dominios extracelulares definidos en el presente documento del receptor de unión a antígeno se dirigen a / se unen a / interactúan con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento de cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y cáncer hemático.

En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende dos dominios de unión dirigidos a / que se unen a / que interactúan con un antígeno tumoral, preferentemente un antígeno tumoral humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel y/o cáncer bucal.

En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra HER1, preferentemente HER1 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel y/o cáncer bucal.

En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra HER2, preferentemente HER2 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento de cáncer gástrico, cáncer de mama y/o cáncer de cuello uterino.

En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra HER3, preferentemente HER3 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer gástrico y/o cáncer de pulmón.

En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra CEA, preferentemente CEA humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra p95, preferentemente p95 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra BCMA, preferentemente BCMA humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra MSLN, preferentemente MSLN humana, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el

tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

5 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra MCSP, preferentemente MCSP humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

10 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra CD19, preferentemente CD19 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

15 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra CD20, preferentemente CD20 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del linfoma de linfocitos B y/o del linfoma de linfocitos T.

20 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra CD22, preferentemente CD22 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del linfoma de linfocitos B y/o del linfoma de linfocitos T.

25 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra CD38, preferentemente CD38 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

30 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra CD52Flt3, preferentemente CD52Flt3 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

35 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra FolR1, preferentemente FolR1 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

40 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra Trop-2, preferentemente Trop-2 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colangiocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de piel, glioblastoma y/o cáncer bucal.

45 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra CA-12-5, preferentemente CA-12-5 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer de mama y/o cáncer gastrointestinal.

50 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra HLA-DR, preferentemente HLA-DR humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer gastrointestinal, leucemia y/o carcinoma nasofaríngeo.

55 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra MUC-1, preferentemente MUC-1 humana, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón y/o cáncer de páncreas.

60 En un modo de realización, se proporciona (i) una molécula de anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra A33, preferentemente A33 humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de colon.

65 En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra PSMA, preferentemente PSMA humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el

tratamiento del cáncer de próstata.

En un modo de realización, se proporciona (i) una molécula de anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra PSCA, preferentemente PSCA humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

En un modo de realización, se proporciona (i) una molécula de anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra el receptor de transferrina, preferentemente el receptor de transferrina humano, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra tenascina, preferentemente tenascina humana, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer de origen epitelial, endotelial o mesotelial y el cáncer hemático.

En un modo de realización, se proporciona (i) un anticuerpo, que comprende uno o dos dominios de unión contra CA-IX, preferentemente XA-IX humana, y un dominio Fc mutado; y (ii) el receptor de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación dirigido a / que se une a / que interactúa con el dominio Fc mutado, para su uso en el tratamiento del cáncer renal.

Otra literatura en relación con uno cualquiera de los anticuerpos, procedimientos, usos y compuestos que se van a emplear de acuerdo con la presente divulgación se puede recuperar de colecciones y bases de datos públicas, usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, la base de datos pública "Medline", disponible en internet, se puede usar, por ejemplo, en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Otras base de datos y direcciones, tales como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, <http://www.tigr.org/>, son conocidas por el experto en la técnica y también se pueden obtener usando, por ejemplo, <http://www.lycos.com>.

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de los procedimientos y composiciones de la presente divulgación. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular ADN, como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina humana se da en: Kabat, E.A. *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta ed., publicación NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

Se determinaron secuencias de ADN por secuenciación de doble hebra.

Síntesis génica

Se generaron segmentos génicos deseados por PCR usando moldes apropiados o bien se sintetizaron por Geneart AG (Ratisbona, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR por síntesis génica automatizada. Se clonaron los segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares en vectores de clonación/secuenciación estándar. Se purificó el ADN plasmídico a partir de bacterias transformadas y se determinó la concentración por espectroscopia UV. Se confirmó la secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados por secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Se diseñaron todas las construcciones con una secuencia de ADN del extremo 5' que codifica un péptido líder que se dirige a proteínas para su secreción en células eucariotas.

Purificación de proteínas

Se purificaron proteínas a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados en referencia a protocolos estándar. En resumen, se aplicaron anticuerpos a una columna Sepharose de proteína A (GE Healthcare) y se lavaron con PBS. Se logró la elución de anticuerpos a pH 2,8, seguida de neutralización inmediata de la muestra. Se separó la

proteína agregada de los anticuerpos monoméricos por cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; GE Healthcare) en PBS o en histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0. Se combinaron las fracciones de anticuerpos monoméricos, se concentraron (si se requirió) usando, por ejemplo, un concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), se congelaron y se almacenaron a -20 °C o -80 °C. Parte de las muestras se proporcionaron para posterior análisis de proteínas y caracterización analítica, por ejemplo, por SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

SDS-PAGE

Se usó el sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usaron geles NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast al 10 % o al 4-12 % (pH 6,4) y un tampón de migración NuPAGE® MES (geles reducidos, con aditivo de tampón de migración antioxidante NuPAGE®) o MOPS (geles no reducidos).

Cromatografía de exclusión por tamaño analítica

Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la determinación de la agregación y del estado oligomérico de los anticuerpos por cromatografía HPLC. En resumen, se aplicaron anticuerpos purificados con proteína A a una columna Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, pH 7,5 en un sistema Agilent HPLC 1100 o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2 x PBS en un sistema Dionex HPLC. Se cuantificó la proteína eluida por absorbancia UV e integración de áreas de picos. El patrón de filtración en gel de BioRad 151-1901 sirvió como patrón.

Producción de anticuerpos

Se introdujeron las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala en la región constante para anular la unión a los receptores gamma Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación de patente internacional n.º WO2012/130831A1. En consecuencia, se introdujeron las mutaciones I253A, H310A y H435A ("AAA") en la región constante para anular la unión a FcRn. Se produjeron los anticuerpos respectivos cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina. Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión para las cadenas pesada y ligera en una proporción 1:1.

Transducción lentivírica de linfocitos T Jurkat NFAT

Para producir vectores lentivíricos, se clonaron las secuencias de ADN respectivas para el ensamblaje correcto del receptor de unión a antígeno dentro del marco de lectura en un vector polinucleotídico lentivírico bajo un promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV) constitutivamente activo. El vector retroviral contenía un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), un elemento del tracto central de polipurina (cPPT), un origen de replicación pUC y un gen que codifica la resistencia a los antibióticos, facilitando la propagación y selección en bacterias.

Para producir partículas víricas funcionales, se realizó una transfección basada en Lipofectamine LTX™ usando células Hek293T confluentes al 60-70 % (ATCC CRL3216) y vectores que contenían CAR, así como vectores de transferencia pCMV-VSV-G: pRSV-REV: pCgpgV en una proporción 3:1:1:1. Después de 48 h, se recogió el sobrenadante, se centrifugó durante 5 minutos a 250 g para eliminar los restos celulares y se filtró a través de un filtro de polietilensulfona de 0,45 o 0,22 µm. Se usaron partículas víricas concentradas (Lenti-x-Concentrator, Takara) para transducir células Jurkat NFAT (Signosis). Se clasificaron las células transducidas positivas como clones individuales o agrupados usando el clasificador FACSARIA (BD Bioscience). Después de la expansión celular a la densidad adecuada, se usaron los linfocitos T Jurkat NFAT para los experimentos.

Ejemplo 1

Se describe en el presente documento un ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales SUDHDL4 que expresan CD20 como células diana y una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 6A) o una población de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 6B) como células diana. Se usó IgG de GA101 con mutación P329G LALA como IgG que, por una parte, reconoce el antígeno tumoral y, por otra parte, es reconocida por los linfocitos T Jurkat NFAT transducidos. Como control positivo, se recubrió una placa de 96 pocillos (Cellstar, Greiner Bio-One, n.º de cat. 655185) con 10 µg/ml de anticuerpo CD3 (de Biolegend®) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4 °C durante la noche o bien durante al menos 1 h a 37 °C. Se lavaron los pocillos recubiertos con CD3 dos veces con PBS; después de la etapa de lavado final, se eliminó por completo el PBS. Se contaron las células efectoras o las células Jurkat NFAT naturales y se verificó su viabilidad usando Cedex HiRes. Se ajustó el número de células a 1x10⁶ células viables/ml. Por lo tanto, se dejó sedimentar una alícuota apropiada de la suspensión celular a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en RPMI-160 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 % (medio de crecimiento) fresco. Se contaron las células diana que expresan el antígeno de interés y también se verificó su viabilidad. Se ajustó el número de células, de

manera análoga a como se describe para las células efectoras, a 1×10^6 células viables/ml en medio de crecimiento. Se sembraron las células diana y las células efectoras en una proporción E:T 5:1 o bien 1:1 (110.000 células por pocillo en total) por triplicado en una placa de cultivo en suspensión de 96 pocillos (Greiner Bio-One). Como siguiente etapa, se preparó una dilución seriada de GA101 con la mutación P329G LALA, dirigido al antígeno de interés, en medio de crecimiento usando una placa de pocillos profundos de 2 ml (Axygen®). Para obtener concentraciones finales que oscilaban entre 1 µg/ml y 0,0001 µg/ml en un volumen final de 200 µl por pocillo, se pipeteó una alícuota de 50 µl de las diferentes diluciones a los pocillos respectivos. Se centrifugó la placa de 96 pocillos durante 2 min a 190 g y TA. Sellada con Parafilm®, se incubó la placa a 37 °C y CO₂ al 5 % en un ambiente húmedo. Después de 20 h de incubación, se mezcló el contenido de cada pocillo pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces usando una pipeta multicanal. Se transfirieron 100 µl de suspensión celular a una nueva placa de 96 pocillos de fondo transparente y plano de color blanco (Greiner Bio-One) y se añadieron 100 µl de ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega). Después de 15 min de incubación en oscuridad en un agitador rotatorio a 300 rpm y TA, se midió la luminiscencia usando un lector de placas Tecan® Spark10M, a 1 s/pocillo como tiempo de detección.

Tras el cocultivo de células diana y efectoras en una proporción 5:1 (puntos) o 1:1 (cuadrados) durante 20 h, los gráficos muestran una activación dependiente de la dosis de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, así como de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD cuando se usó IgG de GA101 con mutación P329G LALA como anticuerpo (figuras 6 A y B, representadas en negro). Cuando se usó la IgG de GA101 sin la mutación P329G LALA (figuras 6 A y B, representadas en gris), no se pudo detectar ninguna activación de los linfocitos T Jurkat NFAT transducidos. Cada punto representa el valor medio de los duplicados biológicos, cada uno realizado como duplicado técnico. Todos los valores se representan con el valor de referencia corregido. La desviación estándar se indica por barras de error.

Ejemplo 2

Se describe en el presente documento un ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT que usa células tumorales SUDHDL4 (figura 7C y 7D) o WSUDLCL2 (figura 7A y 7B) que expresan CD20 como células diana y células Jurkat NFAT de clon único que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD como células diana. Se usó IgG de GA101 con mutación P329G LALA como IgG que, por una parte, reconoce el antígeno tumoral y, por otra parte, es reconocida por los linfocitos T Jurkat NFAT. Se contaron las células efectoras o las células Jurkat NFAT naturales y se verificó su viabilidad usando Cedex HiRes. Se ajustó el número de células a 1×10^6 células viables/ml. Por lo tanto, se dejó sedimentar una alícuota apropiada de la suspensión celular a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en RPMI-160 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 % (medio de crecimiento) fresco. Se contaron las células diana que expresan el antígeno de interés y también se verificó su viabilidad. Se ajustó el número de células, de manera análoga a como se describe para las células efectoras, a 1×10^6 células viables/ml en medio de crecimiento. Se sembraron las células diana y las células efectoras en una proporción E:T 10:1, 5:1 o 1:1 (110.000 células por pocillo en total) por triplicado en una placa de cultivo en suspensión de 96 pocillos (Greiner Bio-One). Como siguiente etapa, se preparó una dilución seriada de GA101 con la mutación P329G LALA, dirigido al antígeno de interés, en medio de crecimiento usando una placa de pocillos profundos de 2 ml (Axygen®). Para obtener concentraciones finales que oscilaban entre 1 µg/ml y 0,0001 µg/ml en un volumen final de 200 µl por pocillo, se pipeteó una alícuota de 50 µl de las diferentes diluciones a los pocillos respectivos. Se centrifugó la placa de 96 pocillos durante 2 min a 190 g y TA. Sellada con Parafilm®, se incubó la placa a 37 °C y CO₂ al 5 % en un ambiente húmedo. Después de 20 h de incubación, se mezcló el contenido de cada pocillo pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces usando una pipeta multicanal. Se transfirieron 100 µl de suspensión celular a una nueva placa de 96 pocillos de fondo transparente y plano de color blanco (Greiner Bio-One) y se añadieron 100 µl de ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega). Después de 15 min de incubación en oscuridad en un agitador rotatorio a 300 rpm y TA, se midió la luminiscencia usando un lector de placas Tecan® Spark10M, a 1 s/pocillo como tiempo de detección.

Tras el cocultivo de células diana y efectoras en una proporción 10:1 (puntos), 5:1 (cuadrados) o 1:1 (triángulos) durante 20 h, los gráficos muestran una activación dependiente de la dosis de IgG de GA101 con P329G LALA de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figuras 7A-D, representadas en negro). Cuando se usó la IgG de GA101 sin la mutación P329G LALA (figuras 7A-D, representadas en gris), entonces solo se pudo detectar una escasa activación de los linfocitos T Jurkat NFAT transducidos a la concentración de anticuerpos más alta de 1 µg/ml. Cada punto representa el valor medio de los duplicados técnicos. Todos los valores se representan con el valor de referencia corregido. La desviación estándar se indica por barras de error.

Ejemplo 3

Se describe en el presente documento un ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT realizado usando células tumorales NIH/3T3-huFAP cl 19 que expresan FAP adherentes como células diana. Como células efectoras, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 8A) o linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-

CD3zSSD (figura 8C). Se usó IgG de FAP 4B9 con mutación P329G LALA como IgG que, por una parte, reconoce el antígeno tumoral y, por otra parte, es reconocida por los linfocitos T Jurkat NFAT. Se incluyó IgG de DP47/vk3 que alberga la mutación P329G LALA como control de isotipo. Como control positivo, se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos (Cellstar, Greiner Bio-One, n.º de cat. 655185) con 10 µg/ml de anticuerpo CD3 (de Biolegend®) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante al menos 1 h a 37 °C. Se lavaron los pocillos recubiertos con CD3 dos veces con PBS; después de la etapa de lavado final, se eliminó por completo el PBS. Se lavaron las células diana NIH/3T3-huFAP cl 19 adherentes una vez con PBS y se separaron con tripsina. Las células separadas se resuspendieron en DMEM + 4,5 g de LD-glucosa + L-glutamina + HEPES 25 mM + FCS al 10 % y Glutamax al 1 %. Se contaron las células efectoras o los linfocitos T Jurkat NFAT naturales y se verificó su viabilidad usando Cedex HiRes. Se ajustó el número de células a 1×10^6 células viables/ml. Por lo tanto, se dejó sedimentar una alícuota apropiada de la suspensión celular a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en RPMI-160 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 % (medio de crecimiento) fresco. Se contaron las células diana que expresan el antígeno de interés y también se verificó su viabilidad. Se ajustó el número de células, de manera análoga a como se describe para las células efectoras, a 1×10^6 células viables/ml en medio de crecimiento. Se sembraron las células diana y las células efectoras en una proporción E:T 5:1 (110.000 células por pocillo en total) por triplicado en una placa de cultivo en suspensión de 96 pocillos (Greiner Bio-One). Como siguiente etapa, se preparó una dilución seriada de un anticuerpo con la mutación P329G LALA, dirigido al antígeno de interés, en medio de crecimiento usando una placa de pocillos profundos de 2 ml (Axygen®). Para obtener concentraciones finales que oscilaban entre 1 µg/ml y 0,0001 µg/ml en un volumen final de 200 µl por pocillo, se pipeteó una alícuota de 50 µl de las diferentes diluciones a los pocillos respectivos. Se centrifugó la placa de 96 pocillos durante 2 min a 190 g y TA. Sellada con Parafilm®, se incubó la placa a 37 °C y CO₂ al 5 % en un ambiente húmedo. Después de 20 h de incubación, se mezcló el contenido de cada pocillo pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces usando una pipeta multicanal. Se transfirieron 100 µl de suspensión celular a una nueva placa de 96 pocillos de fondo transparente y plano de color blanco (Greiner Bio-One) y se añadieron 100 µl de ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega). Después de 15 min de incubación en oscuridad en un agitador rotatorio a 300 rpm y TA, se midió la luminiscencia usando un lector de placas Tecan® Spark10M, a 1 s/pocillo como tiempo de detección.

Las figuras 8 B y 8 D representan datos de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 8 D) o linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 8 B), ambos cocultivados con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo FAP 4B9 en comparación con diferentes condiciones de control.

Tras la incubación con 1 µg/ml de FAP 4B9 P329G LALA, los linfocitos T Jurkat NFAT (figura 8 B y 8 D, triángulo negro), así como solo las células diana (figura 8 B y 8 D, triángulo negro invertido) no muestran ninguna señal de luminiscencia detectable.

Además, los linfocitos T Jurkat NFAT no muestran señal de luminiscencia tras el cocultivo con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo FAP 4B9 (figura 8 B y figura 8 D, rombo negro). Mientras, la activación dependiente de CD3 de las células Jurkat NFAT cocultivadas con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo FAP 4B9 demuestra su funcionalidad a través de una señal de luminiscencia detectable (puntos blancos). La activación dependiente de CD3 de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 8 B, cuadrados blancos) y la activación de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 8 D, representados en cuadrados blancos) cocultivados con células diana y 1 µg/ml del anticuerpo FAP 4B9 muestra las señales de luminiscencia más altas de todas, ya que combina la activación mediada por CAR con la activación mediada por CD3. La señal de luminiscencia mediada por CD3 también es visible cuando los CAR se incuban con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo DP47/vk3 (figura 8 B y figura 8 D, triángulos blancos invertidos). Cada punto representa el valor medio de los triplicados técnicos. Todos los valores se representan con el valor de referencia corregido. La desviación estándar se indica por barras de error.

Ejemplo 4

Se describe en el presente documento un ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales MKN45 que expresan CEA adherente como células diana. Como células efectoras, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 9A) o linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 9C). Se usó IgG de CEA A5B7 o IgG de CEA T84 LCHA, ambas con mutación P329G LALA. Se incluyó además IgG de DP47/vk3 que alberga la mutación P329G LALA como control de isotipo.

Como control positivo, se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos (Cellstar, Greiner Bio-One, n.º de cat. 655185) con 10 µg/ml de anticuerpo CD3 (de Biolegend®) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 h a 37 °C. Se lavaron los pocillos recubiertos con CD3 dos veces con PBS; después de la etapa de lavado final, se eliminó por completo el PBS.

Se lavaron las células diana MKN45 adherentes una vez con PBS y se separaron con tripsina. Las células separadas se resuspendieron en DMEM + 4,5 g de LD-glucosa + L-glutamina + HEPES 25 mM + FCS al 10 % y

Glutamax al 1 %.

Se contaron las células efectoras o las células Jurkat NFAT naturales y se verificó su viabilidad usando Cedex HiRes. Se ajustó el número de células a 1×10^6 células viables/ml. Por lo tanto, se dejó sedimentar una alícuota apropiada de la suspensión celular a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en RPMI-160 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 % (medio de crecimiento) fresco.

Se contaron las células diana que expresan el antígeno de interés y también se verificó su viabilidad. Se ajustó el número de células, de manera análoga a como se describe para las células efectoras, a 1×10^6 células viables/ml en RPMI-1640 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 %.

Se sembraron las células diana y las células efectoras en una proporción E:T 5:1 (110.000 células por pocillo en total) por triplicado en una placa de cultivo en suspensión de 96 pocillos (Greiner Bio-One).

Como siguiente etapa, se preparó una dilución seriada de un anticuerpo con la mutación P329G LALA, dirigido al antígeno de interés, en medio de crecimiento usando una placa de pocillos profundos de 2 ml (Axygen®). Para obtener concentraciones finales que oscilaban entre 1 µg/ml y 0,0001 µg/ml en un volumen final de 200 µl por pocillo, se pipeteó una alícuota de 50 µl de las diferentes diluciones a los pocillos respectivos. Se centrifugó la placa de 96 pocillos durante 2 min a 190 g y TA. Sellada con Parafilm®, se incubó la placa a 37 °C y CO₂ al 5 % en un ambiente húmedo.

Después de 20 h de incubación, se mezcló el contenido de cada pocillo pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces usando una pipeta multicanal. Se transfirieron 100 µl de suspensión celular a una nueva placa de 96 pocillos de fondo transparente y plano de color blanco (Greiner Bio-One) y se añadieron 100 µl de ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega). Después de 15 min de incubación en oscuridad en un agitador rotatorio a 300 rpm y TA, se midió la luminiscencia usando un lector de placas Tecan® Spark10M, a 1 s/pocillo como tiempo de detección.

Tras el cocultivo de células diana y efectoras en una proporción 5:1 (figura 9 A y C, puntos) durante 20 h, los gráficos muestran una activación dependiente de la dosis de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, así como de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD cuando se usó CEA A5B7 con mutación P329G LALA como anticuerpo (figuras 9 A y C, puntos grises). El uso de CEA T84 LCHA con mutación P329G LALA mostró, solo para los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, una activación dependiente de la dosis (figura 9 A, puntos negros). Mientras, cuando se usó el anticuerpo con la mutación P329G LALA, se pudo detectar activación de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD solo a la concentración de anticuerpo más alta de 1 µg/ml.

Cuando se usó IgG de DP47/vk3 con mutación P329G LALA como anticuerpo de control (figura 9 A y C, triángulos negros), no se pudo detectar ninguna activación de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD ni de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD. Cada punto representa el valor medio de los triplicados técnicos. La desviación estándar se indica por barras de error.

Las figuras 9 B y 9 D representan datos de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 9 B) o linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 9 D), ambos cocultivados con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo CEA T8 LCHA P329G LALA o CEA A5B7 P329G LALA en comparación con diferentes condiciones de control.

Tras la incubación con 1 µg/ml de CEA T8 LCHA P329G LALA, los linfocitos T Jurkat NFAT CAR solos (9 B y 9 D, rombo negro), así como las células diana solas (figura 9 B y 9 D, círculo blanco) no muestran ninguna señal de luminiscencia detectable.

Además, los linfocitos T Jurkat NFAT no muestran una señal de luminiscencia detectable tras el cocultivo con células diana y 1 µg/ml de IgG (figura 9 B y Figura 9 D, cuadrado blanco y rombo blanco). Mientras, la activación dependiente de CD3 de los linfocitos T Jurkat NFAT cocultivadas con células diana y 1 µg/ml de IgG demuestra su funcionalidad a través de una señal de luminiscencia detectable (figura 9 B y D, cruz gris).

La activación dependiente de CD3 de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 9 B, estrella negra y estrella gris) y la activación de linfocitos T NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 9 D, estrella negra y estrella gris) cocultivadas con células diana y 1 µg/ml de IgG muestran las señales de luminiscencia más altas de todas, ya que combina la activación mediada por CAR con la activación mediada por CD3. La señal de luminiscencia mediada por CD3 también es visible cuando los CAR se incuban con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo DP47/vk3 (figura 9 B y figura 9 D, signo más gris). Cada punto representa el valor medio de los triplicados técnicos. La desviación estándar se indica por barras de error.

Ejemplo 5

Se describe en el presente documento un ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales MKN45 que expresan CEA adherente como células diana. Como células efectoras, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 10 C) o linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 10 A). Se usó IgG de CH1A1A 98 99 o CEA hMN14, ambas con mutación P329G LALA. Se incluyó además IgG de DP47/vk3 que alberga la mutación P329G LALA como control de isotipo.

Como control positivo, se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos (Cellstar, Greiner Bio-One, n.º de cat. 655185) con 10 µg/ml de anticuerpo CD3 (de Biolegend®) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 h a 37 °C. Se lavaron los pocillos recubiertos con CD3 dos veces con PBS; después de la etapa de lavado final, se eliminó por completo el PBS.

Se lavaron las células diana MKN45 adherentes una vez con PBS y se separaron con tripsina. Las células separadas se resuspendieron en DMEM + 4,5 g de LD-glucosa + L-glutamina + HEPES 25 mM + FCS al 10 % y Glutamax al 1 %.

Se contaron las células efectoras o las células Jurkat NFAT naturales y se verificó su viabilidad usando Cedex HiRes. Se ajustó el número de células a 1×10^6 células viables/ml. Por lo tanto, se dejó sedimentar una alícuota apropiada de la suspensión celular a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en RPMI-160 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 % (medio de crecimiento) fresco.

Se contaron las células diana que expresan el antígeno de interés y también se verificó su viabilidad. Se ajustó el número de células, de manera análoga a como se describe para las células efectoras, a 1×10^6 células viables/ml en RPMI-1640 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 %.

Se sembraron las células diana y las células efectoras en una proporción E:T 5:1 (110.000 células por pocillo en total) por triplicado en una placa de cultivo en suspensión de 96 pocillos (Greiner Bio-One).

Como siguiente etapa, se preparó una dilución seriada de un anticuerpo con la mutación P329G LALA, dirigido al antígeno de interés, en medio de crecimiento usando una placa de pocillos profundos de 2 ml (Axygen®). Para obtener concentraciones finales que oscilaban entre 1 µg/ml y 0,0001 µg/ml en un volumen final de 200 µl por pocillo, se pipeteó una alícuota de 50 µl de las diferentes diluciones a los pocillos respectivos. Se centrifugó la placa de 96 pocillos durante 2 min a 190 g y TA. Sellada con Parafilm®, se incubó la placa a 37 °C y CO₂ al 5 % en un ambiente húmedo.

Después de 20 h de incubación, se mezcló el contenido de cada pocillo pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces usando una pipeta multicanal. Se transfirieron 100 µl de suspensión celular a una nueva placa de 96 pocillos de fondo transparente y plano de color blanco (Greiner Bio-One) y se añadieron 100 µl de ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega). Después de 15 min de incubación en oscuridad en un agitador rotatorio a 300 rpm y TA, se midió la luminiscencia usando un lector de placas Tecan® Spark10M, a 1 s/pocillo como tiempo de detección.

Tras 20 h de cocultivo de células diana y linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD en una proporción 5:1 (figura 10 A, puntos negros y grises), no se puede detectar ninguna activación cuando se usa el anticuerpo CEA hMN14 o el anticuerpo CH1A1A 98 99 (figura 9 A y B, puntos grises). Los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD muestran escasa activación a 0,1 y 1 µg/ml tanto del anticuerpo CEA hMN14 como de los anticuerpos CH1A1A 98 99 (figura 10 C, puntos negros y grises).

Cuando se usó IgG de DP47/vk3 con mutación P329G LALA como anticuerpo de control (figura 10 A y C, triángulos negros), no se pudo detectar ninguna activación de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD ni de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD. Cada punto representa el valor medio de los triplicados técnicos. Todos los valores se representan con el valor de referencia corregido. La desviación estándar se indica por barras de error.

Las figuras 10 B y 10 D representan datos de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura D) o linfocitos T NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 9D), ambos cocultivados con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo CEA hMN14 o de anticuerpo CH1A1A 98 99 en comparación con diferentes condiciones de control.

Ninguno de los experimentos de control realizados muestra ninguna señal de luminiscencia detectable, excepto aquellos en los que se usó CD3 como estímulo de activación. Cada punto representa el valor medio de los triplicados técnicos. La desviación estándar se indica por barras de error.

Ejemplo 6

Se describe en el presente documento un ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales CT26TNC cl 19 que expresan TNC adherente como células diana. Como células efectoras, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 11 C) o linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 11 A). Se usó TNCA2B10 con mutación P329G LALA como IgG. Se incluyó además IgG de DP47/vk3 que alberga la mutación P329GLALA como control de isotipo.

Como control positivo, se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos (Cellstar, Greiner Bio-One, n.º de cat. 655185) con 10 µg/ml de anticuerpo CD3 (de Biolegend®) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 h a 37 °C. Se lavaron los pocillos recubiertos con CD3 dos veces con PBS; después de la etapa de lavado final, se eliminó por completo el PBS.

Se lavaron las células diana CT26TNC cl 19 adherentes una vez con PBS y se separaron con tripsina. Se resuspendieron las células separadas en RPMI-1630 + FCS al 10 % y Glutamax al 1 % + 15 µg/ml de puomicina.

Se contaron las células efectoras o los linfocitos T Jurkat NFAT naturales y se verificó su viabilidad usando Cedex HiRes. Se ajustó el número de células a 1×10^6 células viables/ml. Por lo tanto, se dejó sedimentar una alícuota apropiada de la suspensión celular a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en RPMI-160 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 % (medio de crecimiento) fresco.

Se contaron las células diana que expresan el antígeno de interés y también se verificó su viabilidad. Se ajustó el número de células, de manera análoga a como se describe para las células efectoras, a 1×10^6 células viables/ml en RPMI-1640 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 %.

Se sembraron las células diana y las células efectoras en una proporción E:T 5:1 (110.000 células por pocillo en total) por triplicado en una placa de cultivo en suspensión de 96 pocillos (Greiner Bio-One).

Como siguiente etapa, se preparó una dilución seriada de un anticuerpo con la mutación P329G LALA, dirigido al antígeno de interés, en medio de crecimiento usando una placa de pocillos profundos de 2 ml (Axygen®). Para obtener concentraciones finales que oscilaban entre 1 µg/ml y 0,0001 µg/ml en un volumen final de 200 µl por pocillo, se pipeteó una alícuota de 50 µl de las diferentes diluciones a los pocillos respectivos. Se centrifugó la placa de 96 pocillos durante 2 min a 190 g y TA. Sellada con Parafilm®, se incubó la placa a 37 °C y CO₂ al 5 % en un ambiente húmedo.

Después de 20 h de incubación, se mezcló el contenido de cada pocillo pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces usando una pipeta multicanal. Se transfirieron 100 µl de suspensión celular a una nueva placa de 96 pocillos de fondo transparente y plano de color blanco (Greiner Bio-One) y se añadieron 100 µl de ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega). Después de 15 min de incubación en oscuridad en un agitador rotatorio a 300 rpm y TA, se midió la luminiscencia usando un lector de placas Tecan® Spark10M, a 1 s/pocillo como tiempo de detección.

Tras el cocultivo de células diana y efectoras en una proporción 5:1 (figura 11 A y C, puntos negros) durante 20 h, los gráficos muestran una activación dependiente de la dosis de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, así como de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD cuando se usó TNC A2B10 con mutación P329G LALA como anticuerpo. Cuando se usó IgG de DP47/vk3 con mutación P329G LALA como anticuerpo de control (figura 11 A y C, puntos negros), no se pudo detectar ninguna activación de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD ni de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD. Cada punto representa el valor medio de los triplicados técnicos. Todos los valores se representan con el valor de referencia corregido. La desviación estándar se indica por barras de error.

Las figuras 11 B y 11 D representan datos de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 11 D) o linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 11 B), ambos cocultivados con células diana y 1 µg/ml de TNC A2B10 en comparación con diferentes condiciones de control.

Los linfocitos T Jurkat NFAT no muestran ninguna señal de luminiscencia detectable tras el cocultivo con células diana y 1 µg/ml de IgG (figura 11 B y figura 11 D, triángulo blanco). Mientras, la activación dependiente de CD3 de las células Jurkat NFAT cocultivadas con células diana y 1 µg/ml de IgG demuestra su funcionalidad a través de una señal de luminiscencia detectable (figura 11 B y Figura 11 D, cuadrado blanco).

La activación dependiente de CD3 de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 11 B, círculo blanco) y la activación de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 11 D, círculo blanco) cocultivadas con células diana y 1 µg/ml de IgG muestran las señales de luminiscencia más altas de todas, ya que combina la activación mediada por CAR con la activación mediada por CD3. La señal de luminiscencia mediada por CD3 también es visible cuando

los CAR se incuban con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo DP47/vk3 (figura 11 B y figura 11 D, rombo negro). Cada punto representa el valor medio de los triplicados técnicos. La desviación estándar se indica por barras de error.

5 Ejemplo 7

Se describe en el presente documento un ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales CT26TNC cl 19 que expresan TNC adherente como células diana. Como células efectoras, se usó una población separada de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 12 A). Se usó TNCA2B10 con mutación P329G LALA como IgG. Se incluyó además IgG de DP47/vk3 que alberga la mutación P329G LALA como control de isotipo.

Como control positivo, se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos (Cellstar, Greiner Bio-One, n.º de cat. 655185) con 10 µg/ml de anticuerpo CD3 (de Biolegend®) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 h a 37 °C. Se lavaron los pocillos recubiertos con CD3 dos veces con PBS; después de la etapa de lavado final, se eliminó por completo el PBS.

Se lavaron las células diana CT26TNC cl 19 adherentes una vez con PBS y se separaron con tripsina. Se resuspendieron las células separadas en RPMI-1630 + FCS al 10 % y Glutamax al 1 % + 15 µg/ml de puromicina.

Se contaron las células efectoras o las células Jurkat NFAT naturales y se verificó su viabilidad usando Cedex HiRes. Se ajustó el número de células a 1×10^6 células viables/ml. Por lo tanto, se dejó sedimentar una alícuota apropiada de la suspensión celular a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en RPMI-160 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 % (medio de crecimiento) fresco.

Se contaron las células diana que expresan el antígeno de interés y también se verificó su viabilidad. Se ajustó el número de células, de manera análoga a como se describe para las células efectoras, a 1×10^6 células viables/ml en RPMI-1640 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 %.

Se sembraron las células diana y las células efectoras en una proporción E:T 5:1 (110.000 células por pocillo en total) por triplicado en una placa de cultivo en suspensión de 96 pocillos (Greiner Bio-One).

Como siguiente etapa, se preparó una dilución seriada de un anticuerpo con la mutación P329G LALA, dirigido al antígeno de interés, en medio de crecimiento usando una placa de pocillos profundos de 2 ml (Axygen®). Para obtener concentraciones finales que oscilaban entre 1 µg/ml y 0,0001 µg/ml en un volumen final de 200 µl por pocillo, se pipeteó una alícuota de 50 µl de las diferentes diluciones a los pocillos respectivos. Se centrifugó la placa de 96 pocillos durante 2 min a 190 g y TA. Sellada con Parafilm®, se incubó la placa a 37 °C y CO₂ al 5 % en un ambiente húmedo.

Después de 20 h de incubación, se mezcló el contenido de cada pocillo pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces usando una pipeta multicanal. Se transfirieron 100 µl de suspensión celular a una nueva placa de 96 pocillos de fondo transparente y plano de color blanco (Greiner Bio-One) y se añadieron 100 µl de ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega). Después de 15 min de incubación en oscuridad en un agitador rotatorio a 300 rpm y TA, se midió la luminiscencia usando un lector de placas Tecan® Spark10M, a 1 s/pocillo como tiempo de detección.

Tras el cocultivo de células diana y efectoras en una proporción 5:1 (figura 12 A, puntos negros) durante 20 h, los gráficos muestran una activación dependiente de la dosis de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, comenzando con 0,01 µg/ml de TNC A2B10 con mutación P329G LALA. Cuando se usó IgG de DP47/vk3 con mutación P329G LALA como anticuerpo de control (figura 12 A y C, puntos grises), no se pudo detectar ninguna activación de los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD. Cada punto representa el valor medio de los triplicados técnicos. Todos los valores se representan con el valor de referencia corregido. La desviación estándar se indica por barras de error.

La figura 12 B representa datos de linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, cocultivadas con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo TNC A2B10 en comparación con diferentes condiciones de control.

Las linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD incubados con células diana pero sin anticuerpo (figura 12 B, cuadrado negro), así como las células Jurkat NFAT incubadas con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo TNC A2B10 (figura 12 B, puntos blancos) no muestran ninguna señal de luminiscencia detectable. Mientras, las células Jurkat NFAT cocultivadas con células diana y 1 µg/ml de TNC A2B10, sembradas en pocillos cubiertos con CD3, muestran una clara señal de luminiscencia.

Además, los linfocitos T Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD Fab incubados con células diana y 1 µg/ml de anticuerpo TNC A2B10 o 1 µg/ml de anticuerpo DP47/vk3, en pocillos cubiertos con CD3, muestran una alta señal de luminiscencia. Cada punto representa el valor medio de los triplicados técnicos.

La desviación estándar se indica por barras de error.

Ejemplo 8

Se describe en el presente documento un ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales SUDHDL4 que expresan CD20 como células diana y una población de células Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 13A) o anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 13B) como células efectoras. Se usó IgG de GA101 con mutación P329G LALA, con una mutación P329G D265A, con solo una mutación LALA o sin ninguna mutación como IgG, que, por una parte, reconoce el antígeno tumoral y, por otra parte, es reconocida por los linfocitos T Jurkat NFAT. Se contaron las células efectoras y se verificó su viabilidad usando Cedex HiRes. Se ajustó el número de células a 1×10^6 células viables/ml. Se dejó sedimentar una alícuota apropiada de la suspensión celular a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en RPMI-160 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 % fresco. Se contaron las células diana que expresan el antígeno de interés y también se verificó su viabilidad. Se ajustó el número de células, de manera análoga a como se describe para las células efectoras, a 1×10^6 células viables/ml en medio de crecimiento. Se sembraron las células diana y las células efectoras en una proporción E:T 5:1 (110.000 células por pocillo en total) por triplicado en una placa de cultivo en suspensión de 96 pocillos (Greiner Bio-One). Como siguiente etapa, se preparó una dilución seriada de los diferentes anticuerpos, dirigidos al antígeno de interés, en medio de crecimiento usando una placa de pocillos profundos de 2 ml (Axygen®). Para obtener concentraciones finales que oscilaban entre 1 µg/ml y 10 pg/ml en un volumen final de 200 µl por pocillo, se pipeteó una alícuota de 50 µl de las diferentes diluciones a los pocillos respectivos. Se centrifugó la placa de 96 pocillos durante 2 min a 190 g y TA. Sellada con Parafilm®, se incubó la placa a 37 °C y CO₂ al 5 % en un ambiente húmedo. Después de 20 h de incubación, se mezcló el contenido de cada pocillo pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces usando una pipeta multicanal. Se transfirieron 100 µl de suspensión celular a una nueva placa de 96 pocillos de fondo transparente y plano de color blanco (Greiner Bio-One) y se añadieron 100 µl de ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega). Después de 15 min de incubación en oscuridad en un agitador rotatorio a 300 rpm y TA, se midió la luminiscencia usando un lector de placas Tecan® Spark10M, a 1 s/pocillo como tiempo de detección. Los gráficos muestran una activación dependiente de la dosis de las células diana solo cuando se usan anticuerpos que albergan una mutación P329G o la mutación P329G y la mutación LALA, pero no la mutación LALA sola. Además, no se puede detectar ninguna activación de las células efectoras si se usa el anticuerpo GA101 natural.

Ejemplo 9

Se describe en el presente documento un ensayo indicador de linfocitos T Jurkat NFAT usando células tumorales SUDHDL4 que expresan CD20 como células diana y una población de células Jurkat NFAT que expresan anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 14A) o anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (figura 14B) como células efectoras. Se usó IgG de GA101 con mutación P329G LALA, con una mutación P329G sola, con solo una mutación LALA o sin ninguna mutación como IgG, que, por una parte, reconoce el antígeno tumoral y, por otra parte, es reconocida por los linfocitos T Jurkat NFAT. Se contaron las células efectoras y se verificó su viabilidad usando Cedex HiRes. Se ajustó el número de células a 1×10^6 células viables/ml. Se dejó sedimentar una alícuota apropiada de la suspensión celular a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en RPMI-160 + FCS al 10 % + Glutamax al 1 % fresco. Se contaron las células diana que expresan el antígeno de interés y también se verificó su viabilidad. Se ajustó el número de células, de manera análoga a como se describe para las células efectoras, a 1×10^6 células viables/ml en medio de crecimiento. Se sembraron las células diana y las células efectoras en una proporción E:T 5:1 (110.000 células por pocillo en total) por triplicado en una placa de 384 pocillos. Como siguiente etapa, se preparó una dilución seriada de los diferentes anticuerpos, dirigidos al antígeno de interés, en medio de crecimiento usando una placa de 96 pocillos. Para obtener concentraciones finales que oscilaban entre 1 µg/ml y 10 pg/ml en un volumen final de 30 µl por pocillo, se pipeteó una alícuota de 10 µl de las diferentes diluciones a los pocillos respectivos. Se centrifugó la placa de 384 pocillos durante 2 min a 190 g y TA. Sellada con Parafilm®, se incubó la placa a 37 °C y CO₂ al 5 % en un ambiente húmedo. Después de 20 h de incubación, se añadieron 6 µl de ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega) y la lectura se realizó inmediatamente usando un lector de placas Tecan® Spark10M, a 1 s/pocillo como tiempo de detección. Los gráficos muestran una activación dependiente de la dosis de las células diana solo cuando se usan anticuerpos que albergan una mutación P329G o la mutación P329G y la mutación LALA, pero no la mutación LALA sola. Además, no se puede detectar ninguna activación de las células efectoras si se usa el anticuerpo GA101 natural.

Secuencias ejemplares

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de anti-P329G-ds-scFv:

Construcción	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CDR H1 anti-P329G de Kabat	RYWMN	1
CDR H2 anti-P329G de Kabat	EITPDSSSTNYTPSLKD	2

[illegible]

Tabla 3: secuencias de ADN de anti-P329G-ds-scFv:

Construcción	Secuencia de ADN	SEQ ID NO
--------------	------------------	-----------

Fusión anti-P329G-ds-scFv-	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA	19
CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17096	CAGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG AGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCC TGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCA GCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCG GCAAGTGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCG ACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGCCTGAAGG ACAAGTTTCATCATCAGCAGGGACAAACGCCAAGAACA CCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGG ACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCCACGACT ACGGCGCCTGGTTCCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCGCCCGAGGGGGCGGAAGTGGTG GCGGGGGAAGCGGCGGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGC GGATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTG ACCACCAGCCCCGGCGAGACCGTGACCCGTGACCTGC AGGAGCAGCACCGCGCGCCGTGACCAACCAGCAACTAC GCCAACTGGGTGCAGGAGAAGCCCCAGCACCTGTTC ACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCGTGCCCGCCAGGTTACGCGGCAGCCTGATCGGC GACAAGGCCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCAGACC GAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTAC AGCAACCACTGGGTGTTTCGGCTGTGGCACCAAGCTG ACCGTGCTGGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGCTG GTGGTGCTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTG CTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGGA GCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGA ACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCCACCAGGAAGC ACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGCCG CCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCCG ACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGT ATAACGAGCTGAACTGGGCAGGAGGGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGCAGGGACCCCGA GATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAGG AGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGG CCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAG AGGAGGAGGGGCAAGGGGCCACGACGGCCTGTACCA GGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGC CCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGG	
VH anti-P329G-ds	GAGGTGAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCGACTTCAGCAGGTACTGGATGAACTGG GTGAGGCAGGCCCCCGCAAGTGTCTGGAGTGGATC GGCGAGATCACCCCGACAGCAGCACCATCAACTAC ACCCCAAGCCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGG GACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGATC AAGGTGAGGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGC GTGAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCCGCAGC TGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCC	20
VL anti-P329G-ds	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTGACCACC AGCCCCGGCGAGACCGTGACCCCTGACCTGCAGGAGC AGCACCGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAAC TGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCACTGTTACCCGGC CTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCCGGCGTG CCCGCCAGGTTTCAGCGGCAGCCTGATCGGCGACAAG GCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCAGACCGAGGAC GAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTACAGCAACC ACTGGGTGTTTCGGCTGTGGCACCAAGCTGACCGTGC TG	21

Anti-P329G-ds-scFv	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG AGAGCGGCGGCGGCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCC TGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCA GCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCG GCAAGTGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCCG ACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGCCTGAAGG ACAAGTTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAAC CCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGG ACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCTACGACT ACGGCGCCTGGTTCCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGTG GCGGGGGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGC GGATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTG ACCACAGCCCCGGCGAGACCGTGACCTGACCTGC AGGAGCAGCACC GGCGCCGTGACCACCAGCAACTAC GCCAACTGGGTGCAGGAGAAGCCCCGACCACCTGTTC ACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCGTGCCCGCCAGGTTTCAGCGGCAGCCTGATCGGC GACAAGGCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCAGACC GAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTAC AGCAACCACTGGGTGTTCCGGCTGTGGCACCAAGCTG ACCGTGC	22
IRES EV71, sitio interno de entrada ribosomal	CCCGAAGTAACTTAGAAGCTGTAAATCAACGATCAA TAGCAGGTGTGGCACACCAGTTCATACCTTGATCAAG CACTTCTGTTTCCCCGGACTGAGTATCAATAGGCTGC TCGCGCGGCTGAAGGAGAAAAACGTTCTGTTACCCGAC CAACTACTTCGAGAAGCTTAGTACCACCATGAACGA GGCAGGGTGTTTCGCTCAGCACAAACCCAGTGTAGA TCAGGCTGATGAGTCACTGCAACCCCCATGGGCGAC CATGGCAGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGAG AAATCCATGGGACGCTCTAATTTCTGACATGGTGTGA AGTGCCTATTGAGCTAACTGGTAGTCCTCCGGCCCCCT GATTGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACATGCTCA CAAACCACTGGGTGGTGTGTCTGTAACGGGCAACTCT GCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCT TTTATTCCTATATTGGCTGCTTATGGTGACAAATCAA AAGTTGTTACCATATAAGCTATTGGATTGGCCATCCGG TGTGCAACAGGGCAACTGTTTACCTATTTATTGGTTT TGTACCATTTATCACTGAAGTCTGTGATCACCTCTCAA TTCATTTTGACCCTCAACACAATCAAAC	23
CD28ATD	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTG	24
CD28CSD	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCAACCGC AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTC GCAGCCTATCGCTCC	25
CD3zSSD	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCG TACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGAC AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAA GCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA GTGAGATTGGGATGAAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG GCCCTGCCCCCTCGC	26

CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	TTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCT GCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGCCCTTCATCATCTT CTGGGTGAGGAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACA GCGACTACATGAACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCC CCACCAGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCA GGGACTTCGCCGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCA GCAGGAGCGCCGACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCC AGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGA GGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGC AGGGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGAA GAACCCCCAGGAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAA GGACAAGATGGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGCAT GAAGGGCGAGAGGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACG GCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACA CCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCA GG	27
Elemento T2A	TCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGT GACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGG	28
eGFP	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACGGGGTGCTG CCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGC CACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC ACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTC GTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGC CGCTACCCCGACCATGAAGCAGCACGACTTCTTC AAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTG AACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAG CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC CACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCC GTGCTGCTGCCCCGACAACCCTACCTGAGCACCCAG TCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT CACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGG ATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA	29

<p>Fusión anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD-eGFP pETR17096</p>	<p>ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG AGAGCGGCGGCGGCTGGTGCAGCCGCGGCGAGCC TGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCA GCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCG GCAAGTGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCCG ACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGCCTGAAGG ACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACA CCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGG ACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCTACGACT ACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGTG GCGGGGGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGC GGATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTG ACCACCAGCCCCGCGAGACCGTGACCTTGACCTGC AGGAGCAGCACC GGCGCCGTGACCACCAGCAACTAC GCCAAGCTGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCACCTGTTT ACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCGTGCCCGCCAGGTTTACGCGGCAGCCTGATCGGC GACAAGGCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCAGACC GAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTAC AGCAACCACTGGGTGTTCTGGCTGTGGCACCAAGCTG ACCGTGCTGGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGCTG GTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTG CTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGGA GCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGA ACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCCACCAGGAAGC ACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGCCG CCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCCG ACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGT ATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGCAGGGACCCCGA GATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAGG AGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGG CCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAG AGGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCA GGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGC CCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGGTCCGGAGA GGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA GGAGAATCCCGGCCCTAGGGTGAGCAAGGGCGAGG AGCTGTTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCT GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTC CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC CGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTAC GGCGTGCAAGTCTTCAAGCCGCTACCCCGACCAATG AAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG CACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTC TATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG GTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC AGCGTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACC CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAG TTCGTGACCGCCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGAC GAGCTGTACAAGTGA</p>	<p>30</p>
---	--	-----------

Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de anti-P329G-scFv:

Construcción	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CDR H1 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	1
CDR H2 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	2
CDR H3 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	3
CDR L1 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	4
CDR L2 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	5
CDR L3 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	6
Fusión anti-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSR YWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT LVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQESALT TSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIY FCALWYSNIHWVFEGGTKLTVLGGGGSFWLVVVGGV LACYSLI.VTVAFIHFWVRSKRSRLI.HSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY OGLSTATKDTYDALHMOALPPR	31
VH anti-P329G	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSR YWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TL.YLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT LVTVSA	32
VL anti-P329G	QAVVTQESALT TSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTIT TGAQTEDEAIYFCALWYSNIHWVFEGGTKLTVL	33
Anti-P329G-scFv	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSR YWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TL.YLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT LVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQESALT TSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIY FCALWYSNIHWVFEGGTKLTVL	34
CD28ATD	véase la tabla 2	11
CD28CSD	véase la tabla 2	12
CD3zSSD	véase la tabla 2	13
CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD	véase la tabla 2	14
eGFP	véase la tabla 2	15
conector (G4S)4	véase la tabla 2	16
conector G4S	véase la tabla 2	17
conector T2A	véase la tabla 2	18

5 Tabla 5: Secuencias de ADN de anti-P329G-scFv:

Construcción	Secuencia de ADN	SEQ ID NO
--------------	------------------	-----------

Fusión anti-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD	<p>ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG AGAGCGGCGGCGGCTTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCC TGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCA GCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCG GCAAGGGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCCG ACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGCCTGAAGG ACAAGTTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACA CCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGG ACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCTACGACT ACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGTG GCGGGGGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGC GGATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTG ACCACCAGCCCCGGCGAGACCGTGACCTGACCTGC AGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACCACCAGCAACTAC GCCAAGTGGGTGCAGGAGAAGCCCCAGCACCTGTTT ACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCGTGCCCGCCAGGTTTACGCGGCAGCCTGATCGGC GACAAGGCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCCAGACC GAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTAC AGCAACCACTGGGTGTTTCGGCGGTGGCACCAAGCTG ACCGTGCTGGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGCTG GTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTG CTGGTGACCGTGCCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGGA GCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGA ACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCCACCAGGAAGC ACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGCCG CCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCCG ACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAAGCTGT ATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGCAGGGACCCCCGA GATGGGCGGCAAGCCAGGAGGAAGAACCCCCAGG AGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGG CCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAG AGGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGBCCTGTACCA GGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGC CCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGG</p>	35
VH anti-P329G	<p>GAGGTGAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCGACTTCAGCAGGTACTGGATGAACTGG GTGAGGCAGGCCCCCGGCAAGGGTCTGGAGTGGATC GGCGAGATCACCCCCGACAGCAGCACCATCAACTAC ACCCCCAGCCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGG GACAAACGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAGATGATC AAGGTGAGGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGC GTGAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGC TGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCC</p>	36
VL anti-P329G	<p>CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTGACCACC AGCCCCGGCGAGACCGTGACCCTGACCTGCAGGAGC AGCACCGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAAC TGGGTGCAGGAGAAGCCCCAGCACCTGTTACCGGC CTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCCGGCGTG CCCCGCCAGGTTTACGCGGCAGCCTGATCGGCGACAAG GCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCCAGACCGAGGAC GAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTACAGCAACC ACTGGGTGTTTCGGCGGTGGCACCAAGCTGACCGTGC TG</p>	37
CD28ATD	véase la tabla 3	24
CD28CSD	véase la tabla 3	25

ES 3 010 117 T3

CD3zSSD	véase la tabla 3	26
CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD	véase la tabla 3	27
Elemento T2A	véase la tabla 3	28
eGFP	véase la tabla 3	29
Fusión anti-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD-eGFP	ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG AGAGCGGCGGCGGCCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCC TGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCA GCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCG GCAAGGGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCG ACAGCAGCACCATCAACTACACCCCAAGCCTGAAGG ACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACA CCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGG ACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCTACGACT ACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGTG GCGGGGGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGC GGATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTG ACCACCAGCCCCGGCGAGACCGTGACCCTGACCTGC AGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACCACCAGCAACTAC GCCAACTGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCACTGTTC ACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCC GGCGTGCCCGCCAGGTTACGCGGCAGCCTGATCGGC GACAAGGCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCAGACC GAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTAC AGCAACCACTGGGTGTTCTGGCGGTGGCACCAAGCTG ACCGTGCTGGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGCTG GTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTG CTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGGA GCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGA ACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCAACAGGAAGC ACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGCCG CCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCCG ACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGT ATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGCAGGGACCCCGA GATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCAAG AGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGG	38

	CCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAG AGGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCA GGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGC CCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGGTCCGGAGA GGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA GGAGAATCCCGGCCCTAGGGTGAGCAAGGGCGAGG AGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCT GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTC CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT GACCCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC CGTGCCCTGGCCCCACCTCGTGACCACCTGACCTAC GGCCTGCAGTGCTTACGCCGCTACCCCGACCACATG AAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAA GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC GAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG CACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTC TATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG GTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC AGCGTGCAAGTCGCGGACCACTACCAGCAGAACACC CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAAC CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAG TTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGAC GAGCTGTACAAGTGA	
--	---	--

Tabla 6: Secuencias de aminoácidos de anti-P329G-ds-Fab

Construcción	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CDR H1 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	1
CDR H2 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	2
CDR H3 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	3
CDR L1 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	4
CDR L2 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	5
CDR L3 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	6
Fusión anti-P329G-ds-Fab-cadena pesada-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17100	EVKILLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSR YWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TL YLQMIKVRSED TAL YYCVRPYDYGAWFASWGQGT LVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGS FWVI.VVVGGVLA CYSILVTVAFIIFWVRSKRSRI.LHSD YMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	39
Cadena pesada anti-P329G-ds-Fab	EVKILLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSR YWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TL YLQMIKVRSED TAL YYCVRPYDYGAWFASWGQGT LVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	40

Cadena ligera anti-P329G-ds-Fab	QAVVTQESALTTSPGETVLTCSRSTGAVTTSNYANWV QEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGCGTKLTVLRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTTLTKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	41
VL anti-P329G-ds	véase la tabla 2	9
CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	42
VH anti-P329G-ds	véase la tabla 2	8
CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVITFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	43
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	véase la tabla 2	14

Tabla 7: Secuencias de ADN de anti-P329G-ds-Fab:

Construcción	Secuencia de ADN	SEQ ID NO
Fusión anti-P329G-ds- Fab-cadena pesada- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD pETR17100	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACGGGTGTGCATTCCCAGGCCGTGGTGACCC AGGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACCG TGACCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGA CCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAGC CCGACCACCTGTTACCGGCCTGATCGGCGGCACCA ACAAGAGGGCCCCCGGCGTGCCCGCCAGGTTACGCG GCAGCCTGATCGGCGACAAGGCCGCCCTGACCATCA CCGGCGCCCGAGACCGAGGACGAGGCCATCTACTTCT GCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGCT GTGGCACCAAGCTGACCGTGCTGCGTACGGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGGAATTCCCCGAAGT AACTTAGAAGCTGTAAATCAACGATCAATAGCAGGT GTGGCACACCAGTCATACCTTGATCAAGCACTTCTGT TTCCCCGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGCGG CTGAAGGAGAAAAACGTTTCGTTACCCGACCAACTACT TCGAGAAGCTTAGTACCACCATGAACGAGGCAGGGT GTTTCGCTCAGCACAACCCCAAGTGTAGATCAGGCTG ATGAGTCACTGCAACCCCCATGGGCGACCATGGCAG TGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGAGAAATCCAT GGGACGCTCTAATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTAT TGAGCTAACTGGTAGTCCTCCGGCCCCCTGATTGCGGC	44

	<p>TAATCCTAACTGCGGAGCACATGCTCACAAAACCAAGT GGGTGGTGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAA CCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTTTTATTCCCTA TATTGGCTGCTTATGGTGACAATCAAAAAGTTGTAC CATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTGCAACA GGGCAACTGTTTACCTATTTATTGGTTTTGTACCATT ATCACTGAAGTCTGTGATCACTCTCAAATTCATTTTG ACCCTCAACACAATCAAACGCCACCATGGGATGGAG CTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGT GTGCACTCCGAGGTGAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGC GGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGC TGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAGCAGGTAAGTGG ATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCAAGTGTCTG GAGTGGATCGGCGAGATCACCCCCGACAGCAGCACC ATCAACTACACCCCCAGCCTGAAGGACAAGTTTCATC ATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGGACACCGCCCTG TACTACTGCGTGAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGG TTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTG AGCGCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACA GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGA CCTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG TTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTG CCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAGGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGGAGGGGGCGGA TCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGG CCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCAT CTTCTGGGTGAGGAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCA CAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGGAGGCCCGG CCCCACCAGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCC CAGGGACTTCGCCGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCCGACGCCCCCGCCTACCAGCAGGG CCAGAACCAAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAG GAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGGG GCAGGGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCAGGAGG AAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAG AAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGG CATGAAGGGCGAGAGGAGGAGGGGCAAGGGCCACG ACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGG ACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCC CCAGG</p>	
VL anti-P329G-ds	véase la tabla 3	21
CL	<p>CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG CTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAAGTCTAC GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG</p>	45
VH anti-P329G-ds	véase la tabla 3	20

CH1	GCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACCGTGTCTTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGG CGTGACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGGC CTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTA GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG GTGGAGCCCAAGAGCTGC	46
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	véase la tabla 3	27
Fusión anti-P329G-ds- Fab-cadena pesada- CD28ATD-CD28CSD- CD3ZSSD-eGFP pETR17100	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACGGGTGTGCATTCCCAGGCCGTGGTGACCC AGGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACCG TGACCCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGA CCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAGC CCGACCACCTGTTTACCGGCCTGATCGGCGGCACCA ACAAGAGGGCCCCCGGCGTGGCCGCCAGGTTACGCG GCAGCCTGATCGGCGACAAGGCCGCCCTGACCATCA CCGGCGCCCAGACCGAGGACGAGGCCATCTACTTCT GCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGCT GTGGCACCAAGCTGACCGTGCTGCCGTACGGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGAATTCCCCGAAGT AACTTAGAAGCTGTAAATCAACGATCAATAGCAGGT GTGGCACACCAGTCATACCTTGATCAAGCACTTCTGT TTCCCCGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGCGG CTGAAGGAGAAAACGTTTCGTTACCCGACCAACTACT TCGAGAAGCTTAGTACCACCATGAACGAGGCAGGGT GTTTCGCTCAGCACAAACCCAGTGTAGATCAGGCTG ATGAGTCACTGCAACCCCCATGGGCGACCATGGCAG TGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGAGAAATCCAT GGGACGCTCTAATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTAT TGAGCTAACTGGTAGTCCTCCGGCCCCCTGATTGCGGC TAAATCCTAACTGCGGAGCACATGCTCACAACCAAGT GGGTGGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAA CCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCCTA TATTGGCTGCTTATGGTGACAATCAAAAAGTTGTTAC CATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTGCAACA GGGCAACTGTTTACCTATTTATTGGTTTTGTACCATT ATCACTGAAGTCTGTGATCACTCTCAAATTCATTTTG ACCCCAACACAATCAAACGCCACCATGGGATGGAG CTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGT GTGCACTCCGAGGTGAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGC GGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGC TGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAGCAGGTAAGTGG ATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCAAGTGTCTG GAGTGGATCGGCGAGATCACCCCCGACAGCAGCACC	47

	ATCAACTACACCCCCAGCCTGAAGGACAAGTTCATC ATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGGACACCGCCCTG TACTACTGCGTGAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGG TTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTG AGCGCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACA GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AGCCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGA CCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG TTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTG CCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGGAGGGGGCGGA TCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGG CCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCAT CTTCTGGGTGAGGAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCA CAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGGAGGCCCGG CCCCACCAGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCC CAGGGACTTCGCCGCTACAGGAGCAGGGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCCGACGCCCCCGCCTACCAGCAGGG CCAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAG GAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGGG GCAGGGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCCAGGAGG AAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAG AAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGG CATGAAGGGCGAGAGGAGGAGGGGCAAGGGCCACG ACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACC GCCACCAAGG ACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCC CCAGGTCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACAT GCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGTGA GCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCA TCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCA CCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCTCGTGA CCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTA CCCCAGCCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTC CGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCAT CTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGC CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCG CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGG CAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAA CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA GAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAA CATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA CCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT GCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGC CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT GGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCAC TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA	
--	---	--

Tabla 8: Secuencias de aminoácidos de anti-P329G-Fab:

Construcción	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CDR H1 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	1
CDR H2 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	2
CDR H3 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	3

CDR L1 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	4
CDR L2 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	5
CDR L3 anti-P329G de Kabat	véase la tabla 2	6
Fusión anti-P329G-Fab-cadena pesada-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17594	EVKILLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFDLSRYWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT LVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGS FWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLIISD YMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGIIDGLYQGLSTATKDTYDALIIMQALPPR	48
Cadena pesada anti-P329G-Fab	EVKILLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFDLSRYWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT LVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNIHKPSNTKVDKKVEPKSC	49
Cadena ligera anti-P329G-Fab	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QFKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQTEDEAIYFCALWYSNIHWVFGGGT'KLTVLRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLISKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	50
VL anti-P329G	véase la tabla 4	33
CL	véase la tabla 6	42
VH anti-P329G	véase la tabla 4	32
CH1	véase la tabla 6	43
CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD	véase la tabla 2	14

Tabla 9: Secuencias de ADN de anti-P329G-Fab:

Construcción	Secuencia de ADN	SEQ ID NO
Fusión anti-P329G-Fab-cadena pesada-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17594	ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACGGGTGTGCATTCACAGGCCGTGGTGACCC AGGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACCG TGACCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGA CCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAGC CCGACCACCTGTTACCGGCCCTGATCGGCGGCACCA ACAAGAGGGCCCCCGGCGTGCCCGCCAGGTTTACGCG GCAGCCTGATCGGCGACAAGGCCGCCCTGACCATCA CCGGCGCCCAGACCCGAGGACGAGGCCATCTACTTCT GCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTGCGCG GTGGCACCAAGCTGACCGTGCTGCGTACGGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGGAATCCCCGAAGT AACTTAGAAGCTGTAAATCAACGATCAATAGCAGGT	51

	<p>GTGGCACACCAGTCATACCTTGATCAAGCACTTCTGT TTCCCCGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGCGG CTGAAGGAGAAAAACGTTTCGTTACCCGACCAACTACT TCGAGAAGCTTAGTACCACCATGAACGAGGCAGGGT GTTTCGCTCAGCACAACCCCAAGTGTAGATCAGGCTG ATGAGTCACTGCAACCCCATGGGCGACCATGGCAG TGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGAGAAATCCAT GGGACGCTCTAATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTAT TGAGCTAACTGGTAGTCCTCCGGCCCCCTGATTGCGGC TAATCCTAACTGCGGAGCACATGCTCACAAACCACT GGGTGGTGTGTCGTAAACGGGCAACTCTGCAGCGGAA CCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCCTA TATTGGCTGCTTATGGTGACAATCAAAAAGTTGTTAC CATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTGCAACA GGGCAACTGTTTACCTATTTATTGGTTTTGTACCATT ATCACTGAAGTCTGTGATCACTCTCAAATTCATTTG ACCCTCAACACAATCAAACGCCACCATGGGATGGAG CTGTATCATCCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGT GTGCACTCCGAGGTGAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGC GGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGC TGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAGCAGGTACTGG ATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGCAAGGGTCTG GAGTGGATCGGCGAGATCACCCCGACAGCAGCACC ATCAACTACACCCCGAGCCTGAAGGACAAGTTCATC ATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGGACACCGCCCTG TACTACTGCGTGAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGG TTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTG AGCGCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACA GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGA CCTCCGGCGTGACACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG TTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTG CCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGGAGGGGGCGGA TCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGG CCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCAT CTTCTGGGTGAGGAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCA CAGCGACTACATGAACATGACCCCGAGGAGGCCCGG CCCCACCAGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCC CAGGGACTTCGCCGCTACAGGAGCAGGGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCCGACGCCCCCGCCTACCAGCAGGG CCAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAG GAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGGG GCAGGGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCAGGAGG AAGAACCCCGAGGAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAG AAGGACAAGATGGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGG CATGAAGGGCGAGAGGAGGAGGGGCAAGGGCCACG ACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGG ACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCC CCAGG</p>	
VL anti-P329G	véase la tabla 5	37
CL	véase la tabla 7	45
VH anti-P329G	véase la tabla 5	36
CH1	véase la tabla 7	46
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	véase la tabla 3	27

<p>Fusión anti-P329G-Fab-cadena pesada-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD-eGFP pETR17594</p>	<p>ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACGGGTGTGCATTCCACAGGCCGTGGTGACCC AGGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACCG TGACCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGA CCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAGC CCGACCACCTGTTACCCGGCCTGATCGGCGGCACCA ACAAGAGGGCCCCCGGCGTGCCCGCCAGGTTTCAGCG GCAGCCTGATCGGCGACAAGGCCGCCCTGACCATCA CCGGCGCCAGACCGAGGACGAGGCCATCTACTTCT GCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTTCGGCG GTGGCACCAAGCTGACCGTGCTGCGTACGGTGCGTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG AATAACTTCTATCCCAAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGAATTCCCCGAAGT AACTTAGAAGCTGTAAATCAACGATCAATAGCAGGT GTGGCACACCAGTCATACCTTGATCAAGCACTTCTGT TTCCCCGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGCGG CTGAAGGAGAAAAACGTTTCGTTACCCGACCAACTACT TCGAGAAGCTTAGTACCACCATGAACGAGGCAGGGT GTTTCGCTCAGCACAACCCCAAGTGTAGATCAGGCTG ATGAGTCACTGCAACCCCATGGGCGACCATGGCAG TGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGAGAAATCCAT GGGACGCTCTAATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTAT TGAGCTAACTGGTAGTCCTCCGGCCCCCTGATTGCGGC TAATCCTAACTGCGGAGCACATGCTCACAAACCAGT GGGTGGTGTGTCGTAAACGGGCAACTCTGCAGCGGAA CCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTCCCTTTTATTCCTA TATTGGCTGCTTATGGTGACAAATCAAAAAGTTGTTAC CATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTGCAACA GGGCAACTGTTTACCTATTTATTGGTTTTGTACCATT ATCACTGAAGTCTGTGATCACTCTCAAATTCATTTTG ACCTCAACACAATCAAACGCCACCATGGGATGGAG CTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGT GTGCACTCCGAGGTGAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGC GGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGC TGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAGCAGGTACTGG ATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCGGCAAGGGTCTG GAGTGGATCGGCGAGATCACCCCGACAGCAGCACC ATCAACTACACCCCGAGCCTGAAGGACAAGTTCATC ATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGGACACCGCCCTG TACTACTGCGTGAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGG TTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCTTGGTGACCGTG AGCGCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGCACA GCGGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGA CCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG TTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTG CCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGGAGGGGGCGGA TCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGG</p>	<p>52</p>
---	---	-----------

	CCTGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCAT CTTCTGGGTGAGGAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCA CAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGGAGGCCCGG CCCCACCAGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCC CAGGGACTTCGCCGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCCGACGCCCCCGCCTACCAGCAGGG CCAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAG GAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGGG GCAGGGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCCAGGAGG AAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAG AAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGG CATGAAGGGCGAGAGGAGGAGGGGCAAGGGCCACG ACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGG ACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCC CCAGGTCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACAT GCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGTGA GCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGGCCA TCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA CCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCA CCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCTCGTGA CCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTA CCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC CGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCAT CTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAAGACCCGCGC CGAGGTGAAGTTCGAGGGGCGACACCCTGGTGAACCG CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGG CAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAA CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA GAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAA CATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA CCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT GCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGC CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT GGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCAC TCTCGGCATGUACGAGCTGTACAACTGA	
--	---	--

Tabla 10: Secuencias de aminoácidos de anti-AAA-scFv

Construcción	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CDR H1 anti-AAA de Kabat	SYGMS	53
CDR H2 anti-AAA de Kabat	SSGGSY	54
CDR H3 anti-AAA de Kabat	LOMITGYAMDY	55
CDR L1 anti-AAA de Kabat	RSSQTIVISTGITYLE	56
CDR L2 anti-AAA de Kabat	KVSNRES	57
CDR L3 anti-AAA de Kabat	FQGSHPYIT	58

Fusión anti-AAA-scFv- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLK LSCAASGFTSSYGM5WVRQTPDKRLFWVATISSGGSY IYYPDSVKGRFTISRDNANKNIIYLQMSSSLKSEDTAMYY CARLGMITTG YAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSTGHTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNRISGVPDF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTTFGG GTKLEIKGGGGSFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW VRSKRSLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKITYQPYAPPRDF AAYSRVKFSRSADAPAYQGGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRRGKGHIDGLYQGLSTATKIDTYDALI MQALPPR	59
Anti-AAA-scFv	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLK LSCAASGFTSSYGM5WVRQTPDKRLFWVATISSGGSY IYYPDSVKGRFTISRDNANKNIIYLQMSSSLKSEDTAMYY CARLGMITTG YAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSTGHTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNRISGVPDF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTTFGG GTKLEIK	60
VH anti-AAA	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLK LSCAASGFTSSYGM5WVRQTPDKRLFWVATISSGGSY IYYPDSVKGRFTISRDNANKNIIYLQMSSSLKSEDTAMYY CARLGMITTG YAMDYWGQGTSTVTVSS	61
VL anti-AAA	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSTGHTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNRISGVPDF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTTFGG GTKLEIK	62

Tabla 11: Secuencias de aminoácidos de anti-AAA-Fab

Construcción	Secuencia de proteína	SEQ ID NO
CDR H1 anti-AAA de Kabat	véase la tabla 10	53
CDR H2 anti-AAA de Kabat	véase la tabla 10	54
CDR H3 anti-AAA de Kabat	véase la tabla 10	55
CDR L1 anti-AAA de Kabat	véase la tabla 10	56
CDR L2 anti-AAA de Kabat	véase la tabla 10	57
CDR L3 anti-AAA de Kabat	véase la tabla 10	58
Fusión anti-AAA-Fab- cadena pesada- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLK LSCAASGFTSSYGM5WVRQTPDKRLFWVATISSGGSY IYYPDSVKGRFTISRDNANKNIIYLQMSSSLKSEDTAMYY CARLGMITTG YAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTTFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNIK PSNTRVDDKKVEPKSCGGGGSFVVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWVRSKRSLRLHSDYMNMTPRRPGPIRKHYQ FYAPPRDEAAYSRVKFSRSADAPAYQGGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHIDGLYQGLSTAT KIDTYDALIMQALPPR	63

Cadena pesada anti-AAA-Fab	MNFGHSLVFLALTEKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFPSSYQMSWVRQIPDKLEWVATISSGGSYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARLGMITFGYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVLPKSC	64
Cadena ligera anti-AAA-Fab	DVIMTQTHSLPVSLGDDQASISCRSSQTIVTSTGHTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNIRESGVPIDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVVYCFQDSHVPYITFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNEYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYSISSTITLTKADYFEKLKVVYACEVTHIQGLSSPVTKSENRGEC	65
VL anti-AAA	véase la tabla 10	62
CL	véase la tabla 6	42
VH anti-AAA	véase la tabla 10	61
CH1	véase la tabla 6	43

Tabla 12

Construcción	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CD27 humano	ATGGCGCGCCCGCATCCGTGGTGGCTGTGGCTGCTGGCAGCCCTGGTGGCTGAGCGCGACCCCGGCGCCGAAAAGCTGCCCGGAACGCCATTATTGGGCGCAGGGCAAACGTGTGCTGCCAGATGTGCGAACCGGGCACCTTTCTGGTGAAAGATTGCGATCAGCATCGCAAAGCGGGCCAGTGGGATCCGTGCATTCCGGGCGTGAGCTTTAGCCCGGATCATCATACCCGCCCGCATTCGGAAAGCTGCCGCCATTGCCAACAGCGGCCGTGCTGGTGCCAACTGUAACATTACCGCGAACGCGGAATGCGCGTGCCGCAACGGCTGGCAGTGCCCGGATAAAGAATGCACCGAATGCGATCCGCTGCCGAACCCGAGGCTGACCGCGCGCAGCAGCCAGGCGCTGAGCCCGCATCCGCAAGCCGACCCATCTGCCGTATGTGAGCGAAATGCTGGAAGCGCGCACCGCGGGCCATATGCAGACCCCTGGCGGATTTTCGCCAGCTGCCGGCGCGCACCCCTGAGCACCCATTGGCCGCGCGCAGCGCAGCCCTGTGCAGCAGCGATTTTATTGGCATTCTGGTGATTTTATGCGGCATGTTCTGGTGTTTACCCTGGCGGGCGCGCTGTTTCTGCATCAGCGCCGCAAAATATCGCAGCAACAAAGGCGAAAGCCCGGTGGAACCGCGGAACCGTGCCATTATAGCTGCCCGCGCGAAGAGAAGGCAGCACCATTCGATTCAAGGAAGATTAACGCAACCGGAACCGCGCTGCAGCCCG	66
CD27 humano	MAREHPWWLCVLGTLVGLSATPAKSCPERHYWAQGLKCCQMCEPGTHLVKDCDQIRKAAQCDCPCHGVSESPDIIITRPHICESCRICNSGLIVRNCTITANAECACRNOWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTIIPYVSEVLEARTAGIMQTLADFRQLPARTSTTIWPPQRSLSSTDPIRELVFSGMPLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPLPAITCIYSCPREEGSTIPIQLDYRKIPACSP	67

CD27 murino	<p>ATGGCGTGCCCGCCCGCTATTGGCTGTCATGCTG GGCACCCTGGTGGGCTGAGCGCGACCCTGGCGCCG AACAGCTGCCCGGATAAACATTATTGGAACCGGUGG GGCTGTGCTGCCCGCATGTGCGAACCGGGCACTTTT TTGTGAAAGATTGCGAACAGGATCGCACCGCGGCGC AGTGGGATCCGTGCATTCCGGGCAACCAGCTTTAGCCC GGATTATCATAACCCGCCCCGATTGCGAAAGCTGCCG CCATTGCAACAGCGGCTTTCTGATTCCCAACTGCACC GTGACCGCGAACCGCGGAATGCAGCTGCAAGCAAAAAC TGGCAGTGCCTCGATCAGGAATGCACCGAATGCGAT CCGCGCTGAACCCGCGCTGACCCGCGCAGCCGAGC GAAACCCCGAGCCCGCAGCCCGCGCGACCCATCTG CCCATGGCACCAGAAAAACCGAGCTGGCCGCTGCAT CGCCAGCTGCCGAACAGCACCGTGTATAGCCAGCGC AGCAGCCATCGCCCGCTGTGCAACAGCGATTGCATT CGCATTTTGTGACCTTTAGCAGCATGTTTCTGATTT TGTGCTGGCGCGGATTCTGTTTTCATCAGCGCGCG AACCATGGCCGGAACGAAGATCGCCAGCGCGTGGCG GAAGAACCGTGCCTCGTATAGCTGCCCGCGCGAAGAA GAAGGCAGCGCGATTCCGATTGAGGAAGATTATCGC AAACCGGAACCGCGCTTTTATCCG</p>	68
CD27 murino	<p>MAWPPPYWL.CMLGTLVGLSATLAPNSCPDKITYWTGG GLCCRMCEPQTFFVKDCQDRTAAQCDCPTGTSFSD YHHRPHCLSCRHCNSGFLRNCITVLANAECSCSKNWQC RDQECTECIDPPLNPALTRQPSFTSPQPPPTHLPHGTEK PSWPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSSDCIRIFVTFSSMF LIFVLGAILFFHQRRNHGPNEDRQAVPEEPCPYSCPREE EGSATPIQEDYRKPEPAFYP</p>	69
CD28 humano	<p>ATGCTGCGCTGCTGCTGCGGCTGAACCTGTTTCCGA GCATTACAGGTGACCGCCAAACAAAATTCTGCTGAAAC AGAGCCCGAIGCTGCTGCGGTATGATAACCGCGTGA ACCTGAGCTGCAAATATAGCTATAACCTGTTTACCCG CGAATTTGCGCGGAGCCTGCATAAAGGCCTGGATAG CGCGGTGGAAGTGTGCGTGGTGTATGGCAACTATAG CCAGCAGCTGCAGGTGTATAGCAAAACCGGCTTTAA CTGCGATGGCAAACTGGGCAACGAAAGCGTGACCTT TTATCTGCAGAACCTGTATGTGAACCAGACCGATATT TATTTTTCGAAAAATTGAAGTGATGTATCCGCCGCGGT ATCTGGATAACGAAAAAAGCAACGGCACCATTTATC ATGTGAAAGGCAACATCTGTGCCCGAGCCCGCTGT TTCCGCGCCCGAGCAAAACCGTTTGGGTGCTGGTGGT GGTGGCGGCGTGTGCTGGCGTGCIALAGCCTGCTGGT GACCGTGGCGTTTATTATTTTTTGGGTGCCGAGCAAA CGCAGCCCGCTGCTGCAAGCGATTATATGAACATG ACCCCGCGCGCGCGCGCGCGGACCCGCAACATTAI CAGCCGTATCGCGCGCGCGCGGATTITGGCGCGTATC GCAGC</p>	70
CD28 humano	<p>MELLLLALNLFESIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNL SCKYSYNLFSREFRASLIHKGLDSAVFVCVVYGNYSQQ LQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLVYNQIDYFC KLEVMYPPPYLDNEKSNGTTHVKGKHLCPSPLEPGPSK PEWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFHFWVRSKRSRLIIS DYMNMTPRRPGPIRKHYQPYAPPRDFAAYRS</p>	71

CD28 murino	ATGACCCCTGCGCCCTGCTGTTTCTGGCGCTGAACCTTT TTAGCGTGCAGGTGACCGAAAAACAAAATTCTGGTGA AACAGAGCCCUCTGCTGGTGGTGGATAGCAACGAAG TGAGCCCTOAGCTGCGGCTATAGCTATAACCTGCTGGC GAAAGAAATTTGCGCGGAGCCCTGTATAAAGCCGTGAA CAGCGATGTGGAAGTGTGCGTGGGCAACGGCAACTT TACCTATCAGCCGGCAGTTTCCGAGCAACGGGGAATTT AACTGCCGATGGCGATTTTGATAACGAAACCCGTGACC TTTCGCCCTGTGGAACCTGCATGTGAACCATAACCGATA TTTATTTTTGCAAAATTGAATTTATGTATCCGCCGCC GTATCTGGATAACGAACGCAGCAACGGCACCATTAT TCATATTAAGAAAAACATCTGTGCCATAACCCAGAG CAGCCCCGAAACTGTTTTGGGCGCTGGTGGTGGTGGC GGCGCTGCTGTTTTGCTATGGCCTGCTGGTGACCGTG GCGCTGTGCGTGATTTGGACCAACAGCCGCGGCAAC CGCCTGCTGCAGAGCGATTATATGAACATGACCCCG CGCCGCCCGGGCCGACCCGCAAACCGTATCAGCCG TATGCGCCCGCGCGCGATTTTGGCGCGTATCOCGCC	72
CD28 murino	MTLRLLFLALNTFSVQVTENKILVKQSPLLVDSDNEVSL SCRYSYNLLAKLFRASLYKGVNSDVEVCVGNQNFYQ PQFRSNAHFNCDFDNETVTERLWNLHVNHTDIYFCK IEFMYPPIYLDNERSNGTHIIEKEITCITQSSPKLFWAL VVVAGVLF CYGLLVIVALCVIWTNSRRNRLLQSDYMN MTPRRPGLTRKPYOPYAPARDIAAYRP	73
CD137 humano	ATGGGAAACAGCTGTACAAACATAGTACCCACTCTG TTGCTGGTCCCTCAACTTTGAGAGGACAAGATCATTCG AGGATCCTTGTAAGTAACTGCCAGCTGCTACATTCTG TGATAATAACAGGAATCAGATTTGCAGTCCCTTCCCT CCAAATAGTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAAGGACC TTGTACATATGCAGGCAGTGTAAAGGTGTTTTTCAGG ACCAGGAAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAATGCAGAG TGTGACTGCACTCCAGGGTTTCACTGCTTGGGGCA GGATGCAGCATGTGTGAACAGGATTGTAAACAAGGT CAAGAACTGACAAAAAAAGGTTGTAAAGACTGTTGC TTTGGGACATTTAACGATCAGAAACGTGGCACTCTGT GACCCTGGAACAACTGTTCTTGGATGGAAAGTCTGT GCTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGACGTGGTCTG TGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCCGGAGCATCC TCTGTGACCCCGCTGCCCCCTCCGAGAGAGCCAGGA CACCTCCGCAGATCATCTCTCTCTTCTTGCCTGA CGTCGACTGCGTTGCTCTCTCTGCTGTCTCTCTCACG CTCCGTTTCTCTGTGTGTTAAACGGGGCAGAAAGAAA CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAG TACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCC GATTTCCAGAGAGAGAGAGAGAGGATGTGAACCTGT GA	74
CD137 humano	MGNSCYNIVATLJJVLNFERTRSLQDFCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPNSSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE CSSTSNAECDCPTGFIICLGAGCSMCEDCKQGQELTK KCKKDCCFGTENDQKRGRCPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCCGSPADELSPGASSVTPAPAREPGHSPQHSFE LALSTALLFLLEFLTRFSVVKRGRKKLLYFKQPFMR PVQTTQFEDGCSRFPEEFEGGCEL	75

CD137 murino	<p>ATGGGCAACAACCTGCTATAACGTGGTGGTGGATTGTG CTGCTGCTGGTGGGCTGCGAAAAAGTGGGCGCGGTG CAGAACAGCTGCGATAACTGCCAGCCGGGCACTTT TGCCGCAAAATATAACCCGGTGTGCAAAAGCTGCCCCG CCGAGCACCTTTAGCAGCATTGGCGGCCAGCCGAAC TGCAACATTTGCCGCTGTGCGCGGGCTATTTTCGCT TTAAAAAATTTTGCAGCAGCACCCATAACGCCGAAT GCCAATGCATTGAAGGCTTTTCATTGCCCTGGGCCCCGC AGTGCACCCGCTGCCAAAAAGATTGCCGCCCGGGCC AGGAACTGACCAAAACAGGGCTGCCAAAACCTGCAGCC TGGGCACCTTTAACGATCAGAAACGGCACCCGGCGTGT GCCGCCCGTGGACCAACTGCAGCCTGGATGGCCGCA GCGTGCTGAAAACCCGGCACCAACCGAAAAAGATGTGG TGTCGGGCCCCCGCGGTGGTGAAGCTTTAGCCCCAGCA CCACCATTAGCGTGACCCCGGAAGGCGGCCCGGGCG GCCATAGCCTGCAGGTGCTGACCCCTGTTTCTGGCCT GACCAGCGCGCTGCTGCTGGCGCTGATTTTATTACC CTGCTGTTTAGCGTGCTGAAATGGATTGCAAAAAA TTTCCGCATATTTTAAACAGCCGTTTAAAAAAACCA CCGGCGCGGCGCAGGAAGAAGATGCGTGCACTGCC GCTGCCCGCAGGAAGAAAGAGGCGCGCGCGCGCGC TATGAACTG</p>	76
CD137 murino	<p>MQNNCYNVVVIVLLL VGCEKVGAVQNSCDNCQPGTF CRKYNPVCKSCPPSITSSIGGQPNCLCRVCAGYIRIKK FCYSTHNAECECIBGFHCLGPQCTRCEKDCRPQQLTK QGCKTCSLGTENDQNGTGVCRFWTNCSLDGRSVLKTG TTEKDVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGHSLQVLTL FLALTSALLLALFTLLFSVLKWIRKKFPITFKQPFKTT GAAQEEDACSRCPQEEEGGGGYYL</p>	77
OX40 humano	<p>ATGTGGCTGGGCGCGCGCGCGCTGGGCGCGCGCGCG TGCGCGCGCGCTGCTGCTGCGCGCGCGCGCTGAGC ACCGTGACCGCGCTGCAITGGCTGGGCGGATACTTAT CCGAGCAACGATCGCTGCTGCCATGAATGCCGCCCCG GGCAACGGCATGGTGAGCCGCTGCAGCCGCAGCCAG AACACCGTGTGCGCGCGCGTGCAGCCCGCGCTTTATA ACGATGTGGTGAGCAGCAACCGTGCAAAACCGTGCA CCTGCTGCAACCTGCCGAGCGGCAGCNAACGCAAAAC AGCTGTGCAACCGGACCCAGGATACCGTGTGCCGCT GCCGCGCGCGCACCCAGCCCGCTGGATAGCTATAAAC CGGGCGTGGAATTGCGCGCGCTGCCCGCGCGCGCAT TTAGCCCGCGCGGATAACCAGGCGTGCAAAACCGTGGA CCAATGCAACCCCTGGCGCGCAACATAACCCCTGCAAC CGGCGAGCAACAACAGCGCATGCGATTGCGGAAGATC GCGATCCGCGCGCGCACCCAGCCGAGGAAACCCAGG GCCCCGCGCGCGCGCGGATTACCGTGCAGCCGACCG AAGCGTGGCGCGCGCACCCAGCCAGGGCGCGAGCAACC GCCCCGTGGAAGTGGCGGGCGCGCGCGCGGTGGCGG CGATTCTGGGCGCTGGGCGCTGCTGCTGGGCGCTGCTG GCGCGCTGGCGATTCTGCTGGCGCTGTATCTGCTGCG CCGCGATCAGCGCGCTGCCGCGCGGATGCCATAAACCC GCCGGGCGCGCGCGAGCTTTGCAACCCGATTGAGGA AGAACAGGCGGATGCGCATAGCACCCCTGGCGAAAAAT T</p>	78

OX40 humano	MCVGARRLGRGPCAAALLLGLGLSTVTGLHCVGDTYP SNDRCCHCRPGNGMVSRCSRSQNI VCRPCUPGI YND VVSSKPKCPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCR CRA GTQPLDSYKPGVDCAPCPTGHI FSPGDNQACKPWTNCT LAGKHTLQPASNSDAICLED RDP PATQPQETQGPPARPI TVQPTFAWPRTSQGPSTRPVFVPGGRAVAAILGLGLVL GLLGLPLAII LAIYLIRRDQRI PPDATIKTPGGGSRFTIQ IEQADAHSTLAKI	79
OX40 murino	ATGTATGTGTGGGTGCAGCAGCCGACCGCGCTGCTG CTGCTGGCGCTGACCCCTGGGCGTGACCGCGCGCCGC CIGAACTGCCTGAAACATACTATCCGAGCGGCCAT AAATGCTGCCGCGAATGCCAGCCGGGCCATGGCATG GTGAGCCGCTGCGATCATAACCGCGGATAACCTGTGC CATCCGTGCCGAAACCGGCTTTTATAACGAAGCGGIG AACTATGATACTTGCAAAACAGTGCACCCAGTGC AAC CATCGCAGCGGCAGCGAACTGAAACAGAACTGCACC CCGACCCAGGAIACCCGIGLCCCGCTGCCGCGCGGGC ACCCAGCCGCGCCAGGATAGCGGCTATAAACTGGGC GTGGATTGCGTGCCGTGCCCGCCGGGCCATTTTAGCC CGGGCAACAACCAAGCGTGC AAAACCGTGGACCAACT GCACCCGTAGCGCGCAAAACAGACCCCGCCATCCGGCGA GCGATAGCCTGGATGCGGTGTGCGAAGATCGCAGCC TGCTGGCGACCCCTGCTGTGGGAAACCCAGCGCCCGA CCTTTCCGCCGACCAACCGTGCAGAGCACCACCGTGT GCGCGCGCACCAGCGAACTGCCGAGCCCGCCGACCC TGGTGACCCCGGAAGGCCCGCGCTTTGCCGTGCTGC TGGGCTGGGCTTGGGCTGCTGGCGCCGCTGACCG TGCTGCTGGCGCTGTATCTGCTGCCGAAAGCGGIGC GCCTGCCGAACACCCCGAAACCGTGTGTTGGGCAACA GCITTCGCACCCCGATTCAAGGAAGAACATACCGATG CCCATTTTACCCCTGCCGAAAATT	80
OX40 murino	MYVWVQOPTALLLALTLGV TARREN CVKHTYPSGH KCURFCQPGHGMVSRCDHERDTLCHPCETG FYNLAVN YDTCQCTQCNRHSGSH KQNCPTQDTVCR CRPGTQ PRQDSGYKLGVDCVPCPTGHI FSPGNNQACKPWTNCTL SGKQTRIPASDSLDAVCFDRSLATLLWETQRPTFRPT TVQSTTVWPRTSIELPSPTLYTTEGPAPAVLLGLGLLL APLLVLLALYLLRKA WRLPNIPKPCWGNSTRIPQELH TDAHFTLAKI	81
ICOS humano	ATGAAAAGCGGCCTGTGGTATTTTTTCTGTTTTGCC TGCGCATTAAAGTGCTGACCGGCGAAATTAACGGCA GCGCGAACTAIGAAAIGTTTTATTTTTCATAACGGCGG CGTGCAATTCGTGGCAAATATCCGGATATTGTGCAG CAGTTTAAATGCAGCTGCTGAAAGCGCGGCCAGATT CTGTGCGATCTGACCAAAACCAAAGGCAGCGGCAAC ACCGTGAGCAITAAAAGCCTGAAATTTTGCCATAGC CAGCTGAGCAACAACAGCGTGAGCTTTTTCTGTATA ACCTGGATCATAGCCATGCCGAAC TATTATTTTGCAA CCIGAGCATTTTGATCCCGCCCGCTTTAAAGTGACC CTGACCGCGCGCTATCTGCATATTATGAAAAGCCAG CTGTGCTGCCAGCTGAAATTTTGGCTGCCGATTGGCT GCGCGCGCTTTGTGGTGGTGTGCATTCTGGGCTGCAT TCTGATTTGCTGGCTGACCAAAAAAATATAGCAG CAGCGTGATGATCCGAACGCGGAATATATGTTTAT GCGCGCGGTGAACACCCCGAAAAAAGCGCGCTGAC CGATGTGACCCGT	82

ICOS humano	MKSGILWYFFLFCIRIKVL.TGTEINGSANYPMFIFINGGV QILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTKTKGSGNTVSI KSLKFCISQLSNNSVSEFLYNLDHSHANYFCNLSHDP PFFKVTLTGGYLLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVGCI LCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMAVNTAKKS RLTDVTL	83
ICOS murino	ATGAAAACCGTATTTTTGCCCGCGTGTGTGTGTTTGCTT TCIGATTCCCTGCGACCCGCGUAAATTAACGGCAG CGCGGATCATCGCATGTTIAGCTTTCATAACGGCGGC GTGCAGATTAGCTGCAAAATATCCGGAAACCGTGCAG CAGCTGAAAATGCGCCTGTTTCGGCAACCGGAAGTG CTGTGCCAACTGACCAAAACCAAAGGCAGCGGCAAC GCGGTGAGCAITAAAAACCGGATGCTGTGCGCTGAT CATCTGAGCAACAACAGCGTGAGCTTTTTTCTGAACA ACCGGGATAGCAGCCAGGGCAGCTAATTATTTTACA GCTGAGCAETTTIGATCCGCCGCGCTTTCAGGAACG CAACCTGAGCGCGCGCTATCTGCATAATTATGAAAAG CCAGCTGTGCTGCCAGCTGAAACTGTGGCTGCCGCT GGGCTGCCGCGCGTTTGTGGTGGTGCTGCTGTTTGGC TGCAATCTGATTATTTGGTTTAGCAAAAAAAATATG GCAGCAGCGTGATGATCCGAACAGCGAATATATGT TTATGGCGGCGGTGAACACCAACAAAAAAGCCGCC TGCGCGGCGTGACCAAC	84
ICOS murino	MKPYFCRVFVFCFLIRLLTGEINGSDHHRMFSEHNGGV QISCKYPLVQQLKMRLFREREVLCELTKTKGSGNAVS IKNPMCLYHL SNNSVSEFLNPDSSQGSYFCSLSHDP PFFQERNLSGGYLLHIYESQLCCQLKLWLPVGCAAFVVV LLEGCILHWFSSKKKYGSSVHDPNSFYMFMAAVNTNKK SRLAGVTS	85
DAP10 humano	ATGATTCACTCGGGCCATATTCTGTTTCTGCTGCTGC TGCCGGTGCGCGGCGCGGCAGACCAACCCCGGGCGAAC GCAGCAGCCTGCGCGCGTTTATCCGGGCACCAGCG GCAGCTGCAGCGGCTGCGGCAGCCTGAGCCTGCCGC TGCTGGCGGCGCTGCTGCGCGCGGATGCGGTGGCGA GCCGCTGATTGTGGCGCGCGGTGTTTCTGCGCGCGC CCCGCGCCCGAGCCCGCGCGCAAGAGATGGCAAAAGI GTATATTAAATGCGCGGCGCGCGC	86
DAP10 humano	MIILGHILFLLLLPVAAAQTTPCHRSSLPAFYPOTSGSCS GCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSP AQEDGKVYINMPGRG	87
DAP10 murino	ATGCAATCCGCGCGGCTATCTGCTGTTTCTGCTGCTGC TGCCGGTGCGCGGCGAGCCAGACCAGCGCGCGGCGAGCT GCAGCGGCTGCGGCACCTGAGCCTGCCGCTGCTGG CGCGCCTGCTGCGCGCGGATGCGGTGATGAGCCTGC TGATTGTGGCGGTGGTGTGTTGTGTCATCGCCCGCA TGCGCGCCCGGCGCAGGAAGATGGCCGCGTGTATAT TAACATGCCCGGCGCGCGC	88
DAP10 murino	MDPPGYLLFLLLLPVAASQTSAGSCSGCGTSLPLLAGL VAADAVMSLIVGVVFVCMRPIGRPAQEDGRVYINMP GRG	89
DAP12 humano	ATGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGCTCCTGCTC CTGCCCTCCTGCTGGCTGTAAGTGCTCCTCGTCTG TCCAGGCCCAAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTA CGGTGAGCCCGGGCGTGGTGGCAGGGATCGTGAAG GAGACCTGGTGTGACAGTGCTCATTGCCCTGCCCGT GTACTTCCTGGGCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGG GGCTGCGGAGGCAGCGAACCCGGAAACAGCGTATCAC TGAGACCGAGTCGCCCTATCAGGAACCTCAGGGTCA GAGGTGGGATGTCACAGCGACCTCAACACACAGAG GCCGTATTACAAATGA	90

DAP12 humano	MGGLEPCSRILLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCTV SPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAB AATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDELNTQRPYYK	91
DAP12 murino	ATGGGGGCTCTGGAGCCCTCCTGGTGCCTTCTGTTC TTCCTGTCTCTGACTGTGGGAGGATTAAGTCCCGT ACAGGCCACAGGTGACACTTTCUAAAGATGCGACTG TTCCTCCGIGAGCCCTGGIGTACTGGCTGGGATTGT CTGGGTGACTTGGTGTGACTCTGCTGATTGCCCTGG CTGTGTACTCTCTGGGCCGCTGGTCTCCCGAGGTCA AGGGACAGCGGAAGGGACCCGGAACAACACATTG CTGAGACTGAGTCCGCTTATCAGGAGCTTCAGGCTC ACAGACCAGAACTATACAGTQACCTCAACACACAGA GGCAATATACAGATGA	92
DAP12 murino	MGALEPSWCLLPVLLTVGGLSFVQAQSDTFPRDCS SVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYSLGRLVSRGQGT AEGTRKQIIAETESPYQELQGQRPEVYSDELNTQRYR	93
CD3z humano	MKWKALFIAAILQAQLPTTEAQSFGLLDPKLCYLLDG LEIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREFYDVLDKRRGRDPFMGGKQRRKNPQRLYNF LQKDKMALAYSEIGMKGERRRRGKHIDGLYQQLSTAT KDIYDALIMQALPFR	94
CD3z humano	ATGAAGTGGAAGGCGCTTTTCACCGCGGCCATCCTG CAGGCACAGTTGCCGATTACAGAGGCACAGAGCTTT GGCCTGCTGGATCCCAAACCTGTCTACCTGCTGGATG GAATCCTCTTCATCTATGGTGTCTTCTCACTGCCTT GTTCCTGAGAGTGAAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAGCC CCCCGCGTACCAGCAGGCGCCAGAACCCAGCTCTATAA CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGT TTTGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGG GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCC TGLACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCCGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGA GGGGCAAGGGCGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA GLACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACA TGCAGGCCCTGGCCCCCTCGCTAA	95
CD3z murino	MKWKVSVLACHVRFPGAEASFGLLDPKLCYLLDG LEIYGVILTALFLRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELN GRREEYDVLKKRRARDPEMGGKQRRRRNPQEGVYNA LQKDKMAHAYSEIGTKGERRRGKHIDGLYQQLSTATK DTYDALIMQTLAPR	96
CD3z murino	ATGAAGTGGAAGAGTGTCTGTTCTCGCCTGCATCCTCC ACGTGCGGTTCCAGGAGCAGAGGCACAGAGCTTTG GTCTGCTGGATCCCAAACCTCTGCTACTTGTAGATGG AATCCTCTTCATCTACGGAGTCATCATCACAGCCCTG TACCTGAGAGCAAAATTCAGCAGGAGTGCAGAGACT GCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCACTCTACAAT GAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACCTC TTGGAGAAGAAGCCGGCTCGGGATCCAGAGATGGG AGGCAAACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCAAGGAAG GGTATACAAIGUACTGCAGAAAGACAAGATGGCAG AAGCTTACAGTGAATCGGACACAAAAGGCGAGAGG CGGAGAGGCAAGGGGCAAGATGGCCTTTACCAGGGT CTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTG CATAIGCAGACCCTGGCCCCCTCGCTAA	97
FCGR3A humano	MWQLILLPTALLLLVSAGMRTEFLPKAVVFLFPQWYRV LEKDSVTLKCCQGAYSPEDNSTQWFHINESLSSQASSYEI DAATVDDSGLYRCQTNLSTLSDPVQLFVITGWLLIQAP RWVFKELDPHILRCHISWKNALHKLVIYLNQNGKGRKYF HENSDFYLPKAILKDSGSYFCRGLFGSKNVSSIEVNIII TQGLAVSLISSEFPQYQVSECLVMVLLFAVDITGLYFSV KTNIRSSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK	98

FCGR3A humano	ATGTGGCAGCTGCTGCTGCCGACCGCGCTGCTGCTGC TGGTGAGCGCGGGCATGCGCACCGAAGATCTGCCGA AAGCGGTGGTGTCTTCTGGAACCGCAGTGGTATCGCG TGCTGGAAAAAGATAGCGTGACCCGAAATGCCAGG GCGCGTATAGCCCGGAAGATAACAGCACCCAGTGGT TTCATAACGAAAAGCCTGATTAGCAGCCAGGCCAGCA GCTATTTTATTGATGCGGGCACCCTGGATGATAGCG GCGAATATCGCTGCCAGACCAACCTGAGCACCCCTGA GCGATCCGGTGCAGCTGGAAGTGCATATTGGCTGGC TGCTGCTGCAGGCGCCGCGCTGGGTGTTTAAAGAAAG AAGATCCGATTTCATCTGCGCTGCCATAGCTGGAAAA ACACCGCGCTGCATAAAGTGAUCCATCTGCAGAACG GCAAAAGCCCGCAAAATATTTTCATCATAACAGCGATT TTATATTCCGAAAAGCGACCCCTGAAAGATAGCGGCA GCTATTTTTCGCCCGGGCTGTTTGGCAGCAAAAACGT GAGCAGCGAAACCGTGAACATTACCATTACCCAGGG CCTGGCGGTGAGCACCATTAGCAGCTTTTTTCGGCG GGCCTACAGGTGAGCTTTTGCTGGTGATGGTGCCTGC TCTTTCCGGTGGATACCGGCCCTGATTTTTCAGCGTGAA AACCAACATTCGCAGCAGCACCCCGCGATTGGAAAGA TCATAAATTTAAATGGCGCAAAGATCCGCAGGATAA A	99
FCGR3A murino	MFQNAHSGSQWLLPPLTILLLEAFADRQSAALPRAVVK LDPPWIQVLKFDMYTLMCPGTTINPGNSSTQWFHNGRS IRSQVQASYIFKATVNDSGEYRCQMEQTRI.SDFVDE.G VISDWLL.LQTPQRVFL.EGF.TITL.RCTISWRNKLLNRISFF ITNEKSVRYTHIYKSNESTPKANISISGDIYCKGSLGSTQ IIQSKPVTITVQDPATTSSISLVWYHTAFSL.VMCLLEAFV DTGL.YFYVRRNL.QTPRE.YWRKSL.SRRKHQAPQDX	100
FCGR3A murino	ATGTTTCAGAAATGCACACTCTGGAAAGCCAATGGCTA CTTCCACCACTGACAAATTCTGCTGCTGTTTGCCTTTC AGACAGUCAGAGTCCAGCTCTTCCGAAGGCTGTGGT GAAACTGGACCCCCCATGGATCCAGGTGCTCAAGGA AGACATGGTGACACTGATGTGCGAAGGGACCCACAA CCCTGGGAACCTCTTCTACCCAGTGGTTCCACAACGGG AGGTCCATCCGGAOCCAGGTCCAAGCCAGTTACACG TTTAAGGCCACAGTCAAIGACAGTGGAGAATAATCUO TGTCAAATGGAGCAGACCCGCCCTCAGCGACCCCTGTA GATCTGGGAGTGATTTCTGACTGGCTGCTGCTCCAGA CCCCCTCAGCGGGTGTTTCTGGAAGGGGAAACCATCA CGCTAAGGTGECATAGCTGGAGGAACAAACTACTGA ACAGGATCTCATTTCTCCATAATGAAAAATCCGTGA GGTATCATCACTACAAAAGTAATTTCTCTATCCCAAA AGCCAACCAACAGTCAACAGTGGGGACTACTACTGCAA AGGAAGTCTAGGAAGTACACAGCACCAAGTCCAAGCC TGTCACCATCACTGTCCAAGATCCAGCAACTACATCC TCCATCTCTCTAGTCTGGTACCACACTGCTTCTCTCCCT AGTGATGTCCCTCCCTGTTTGCAGTGGACACGGGCCCT TATTTCTACGTACGGAGAAATCTTCAAACCCCGAGG GAGTACTGGAGGAAGTCCCTGTCAATCAGAAAGCAC CAGGCTCCTCAAGACAAGTGA	101
NKG2D humano	MGWIRGNRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSRWQK QRCPVVKSKCRENASPFFCCFIAMGIRFIMVAIWS AVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPNWICYKNNCYQF FDESKNWYESQASCM8QNASLLKVYSKEDQDILLKLVK SYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSLSPNLLTHIEMQKGD CALYASSFKGYHNCSTPNTYICMQRTV	102

NKG2D humano	ATGGGCTGGATTTCGCGGCCGCGCCAGCCGCCATAGC TGGGAAATGAGCGGAATTTTCATAACTATAACCTGGAT CTGAAAAAAAGCGAATTTAGCACCCGCTGGCAGAAA CAGCGCTGCCCGGTGCTGAAAAGCAAATGCCCGGAA AACCGGAGCCCGTTTTTTTTTTCGCTGCTTATTGCGG GGCGATGGGCATTTCGCTTTATTATTATGGTGGCGATT TGGAGCGCGGTGTTTCTGAACAGCCTGTTTAACCAG GAAGTGCAGATTCCGCTGACCGAAAAGCTATTGCCGC CCGTCGCCGAAAAACTGGATTTCCTATAAAAAACAAC TGCTATCAGTTTTTTTGATGAAAAGCAAAAACCTGGTATG AAAGCCAGGCGAGCTGCATGAGCCAGAACCGGAGC CTGCTGAAAAGCTATAGCAAAGAAAGATCAGGATCTG CTGAAAACCTGGTGAAAAGCTATCATTGGATGGGCTG GTGCATATTCCGACCAACGGCAGCTGGCAGTGGGAA GATGGCAGCATTCTGAGCCCGAACCTGCTGACCATT ATTGAAATGCAGAAAGGCGATTGCGCGCTGTATGCG AGCAGCTTIAAAGGCTATATTGAAAACCTGCAGCACC CGAACACCTATATTTCATGCGAGCGCACCCTG	103
NKG2D murino	MALIRDRKSHISEMSKCHINYDLKPAKWDTSQEQQKQ RLALITTSQPGENGHIIRGRYPIFKIKISPMFVVRVLAIALA IRFLLNTLMWLAIPIKLETFQPVLCNKEVPVSSREGYCGPC PNNWICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQASCLSQNSSLLKI YSKEEQDFLKL VKSYHWMGLVQIPANGSWQWEDGSS LSYNQLITLVEIPKGSCLVYGSSEFKAYTEDCANLNTYIC MKRAV	104
NKG2D murino	ATGGCGCTGATTTCGCGATCGCAAAAGCCATCATAGC GAAATGAGCAAATGCCATAACTATGATCTGAAAACCG GCGAAATGGGATACCAGCCAGGAACAGCAGAAAACA GCGCTGGCGCTGACCACCAGCCAGCCGGGCGAAAAA CGGCATTATTTCGCGGCCGCTATCCGATTGAAAAACT GAAAATTAGCCCGATGTTTGTGGTGGCGCTGCTGGC GATTGCGCTGGCGATTTCGCTTTACCCTGAACACCCTG ATGTGGCTGGCGATTTTTTAAAGAAAACCTTCAGCCGG TGCTGTGCAACAAAGAAAGTGCCGGTGAGCAGCCGG AAGGCTATTGCGGCCCGTGCCCGAACAACCTGGATT GCCATCGCAACAACCTGCTATCAGTTTTTTTAAACGAAAG AAAAACCTGGAACAGAGCCAGGCGAGCTGCCTGAG CCAGAACAGCAGCCTGCTGAAAATTTATAGCAAAGA AGAACAGGATTTTCTGAAACTGGTGAAAAGCTATCA TTGGATGGGCTGGTGACAGATTCCGGCGAACCGCAG CTGGCAGTGGGAAGATGGCAGCAGCCTGAGCTATAA CCAGCTGACCCTGGTGGAAATTCGAAAAGGCAGCTG CGCGGTGTATGGCAGCAGCTTTAAAGCGTATACCGA AGATTGCGCGAACCTGAACACCTATATTGCGATGAA ACGCGCGGTG	105
CD28 YMNM	YMNM	106
CD28 PYAP	PYAP	107
CD28 FMNM	FMNM	108
CD28 AYAA	AYAA	109
Péptido señal	ATMGWSCILFLVATATGVIS	110
Secuencia de ADN del péptido señal	ATGGGATGGAGCTGTAICATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGCTGCACTCC	111

Cadena pesada anti-CD20 (GA101)	QVQLVQSGAEYKKPGSSVKVSCKASGYAFSSYSWTNWV RQAPGQGLEFWMGRIEFGDGDITDYNKFKGRVTITADK STSLAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWG QGTLVI VSSASTKQPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQT YICNVNIHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT ITCTPCPAPEELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHIEDPEVKFNWYVDGVEVIINAKTKPREEQYNS TYRVVSVLT VLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVFEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFPSCSVMHIALHNHYTQKSLSLSPGK	112
Cadena ligera anti-CD20 (GA101)	DIVMTQTITSLPVTTPGEPAISCRSSKSELISNGITYL YW YLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSUTDETL KISRVEAEDVGVYYCAQNLLEPYTFGGGT KVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTLKADYE KIKVYACEVTHIQGLSSPVTKSENRLGC	113
Cadena pesada anti-FAP(4B9) PGLALA	EVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSE NTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLT VTVSSASTKQPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQT YICNVNIHKPSNTKVDKKVEPKSCDETHITCP PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHIEDPEVKFNWYVDGVEVIINAKTKPREEQYNSITYR VSVLT VLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VFEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFPSCSVMHIALHNHYTQKSLSLSPGK	114
Cadena ligera anti-FAP (4B9)	EIVLTQSPGTLISLSPGERATISCRASQSVTSSYLAWYQQ KPGQAPRI LINVGSRRATGPRDFSGSGSGTDFTLTISR EPIDEAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTLKADYETIKVY ACEVTHIQGLSSPVTKSENRLGC	115
Cadena pesada anti-CEA (A5B7) PGLALA	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTVSSYWMITWV RQAPGKGLEWVGFI RNKANGGTTEYAASVKGRFTISR DSEKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDRGLRFYFDY WGQGTITVTVSSASTKQPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQT YICNVNIHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTITITCTPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHIEDPEVKFNWYVDGVEVIINAKTKPREEQ YNSITYRVVSVLT VLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVFWLSNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLITVDKSRWQQGNVFPSCSVMHIALHNHYTQKSLSLSP GK	116
Cadena ligera anti-CEA (A5B7)	QAVLTQPAISASPGASASITCTLERGINVGAYSTYWWY QQKPGSPQQYILRYKSDSDKQQGSGVSSRFASAKDASA NAGIILISGLQSEDEADYYCMHWISGASAVFGGGTKIT VLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTL KADYETIKVYACEVTHIQGLSSPVTKSENRLGC	117

Cadena pesada anti-CEA (T84.66LCHA) PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGFINIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMEISSLRSEDTAVVYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPSSSLGTQTYICNVNIKPSNITKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRIEQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKLEYKCKVSNKALGAPILKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTITPPVLDSDGSIFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK	118
Cadena ligera anti-CEA (T84.66LCHA)	ELVLQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVQGLHWYQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARESGSGSGTDFTLTISKLEPEDFAVYYCQQTNEIDPYTEGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPNDEQKLKSGTASVVCLLNNEYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	119
Cadena pesada anti-CEA (CH1A1A98/992F1) PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEETKGRVTITDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPSSSLGTQTYICNVNIKPSNITKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRIEQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKLEYKCKVSNKALGAPITKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTITPPVLDSDGSIFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK	120
Cadena ligera anti-CEA (CH1A1A98/992F1)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASAAVGTYYVAWYQKPKGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPHDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNEYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	121
Cadena pesada anti-CEA (hMN14) PGLALA	EVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCSASGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWIGEIHPDSSITNYAPSLKDRFTISRDNANKNILFLQMDSLRFEDTGYYFCASLYFGFPWFAYWGQGTPTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPSSSLGTQTYICNVNIKPSNITKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRIEQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKLEYKCKVSNKALGAPITKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTITPPVLDSDGSIFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK	122
Cadena ligera anti-CEA (hMN14)	DIQLTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVGTSAWYQQKPKGKAPKLLIYWTSTRIITGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPHDFATYYCQYSLYRSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNEYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	123

Cadena pesada anti-TNC (2B10) PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFFSSYAISWV RQAPGQGLFWMGGHPIEGTANYAOKFOGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYGYAYYGAFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLV KDYEPFPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSV VVTVPSSSLGTQTYICNVNTHKPSNTRVDKKVEPKSCDK TITCPPCPAPRAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPRELPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWLSNGQPEINNYKLTTPVLDSDGSFELYSKLT VDKSRWQQGNVSCSYVMHLEALHNHYTQKSLSLSPGK	124
Cadena ligera anti-TNC (2B10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIHNDLGWYQQ KPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDEFTLTISSL QPEDFATYYCLQNGLPATFGQGTKEIKRTVAAPSVE IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSFTYSLSSITLTSKADYEKHKVY ACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC	125
Cadena pesada 1 anti-HER2 (PER) PG LALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDVTMDWV RQAPGKGLLWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDR SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWG QGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLVK DYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSV VVTVPSSSLGTQTYICNVNTHKPSNTRVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPRAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPEINNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLT VDKSRWQQGNVSCSYVMHLEALHNHYTQKSLSLSPGK	126
Cadena ligera 1 anti-HER2 (PER)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVSIQVAVWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDEFTLTISSL QPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVE IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSFTYSLSSITLTSKADYEKHKVY ACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC	127
Cadena pesada 2 anti-HER2 (PER) PG LALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDVTMDWV RQAPGKGLLWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDR SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWG QGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLVK DYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSV VVTVPSSSLGTQTYICNVNTHKPSNTRVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPEINNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLT VDKSRWQQGNVSCSYVMHLEALHNHYTQKSLSLSPGK	128
Cadena ligera 2 anti-HER2 (PER)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVSIQVAVWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDEFTLTISSL QPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVE IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSFTYSLSSITLTSKADYEKHKVY ACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC	129

ES 3 010 117 T3

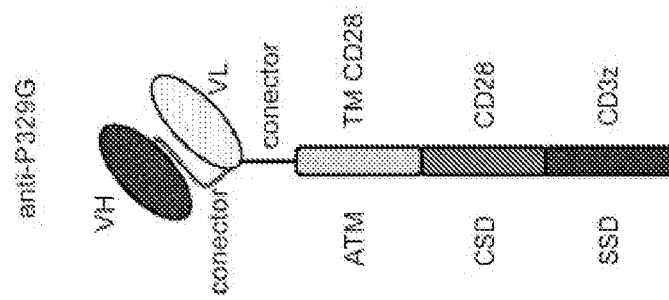
Fc de IgG1 humana	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYTPEPVTV SWNSGALTSGVITFPAVLQSSQLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTIKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDITLISRTEFVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVIINAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTIV LIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGEYPSDIAVEWESN GQPFENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMIFFALINITYTQKSLSLSPGK	130
-------------------	--	-----

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de unión a antígeno que comprende un dominio transmembranario de anclaje y un dominio extracelular que comprende un resto de unión a antígeno, en el que el resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un dominio fragmento cristizable (Fc) mutado pero no se puede unir específicamente al dominio Fc original no mutado, en el que el resto de unión a antígeno es un scFv, en el que el dominio Fc original no mutado es un dominio Fc de IgG1 humana, en el que el dominio Fc mutado es un dominio Fc de IgG1 humana que comprende solo las mutaciones aminoácidas L234A, L235A y P329G, y en el que el receptor de unión a antígeno comprende además al menos un dominio de señalización estimulante y, opcionalmente, al menos un dominio de señalización coestimulante.
2. El receptor de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que el dominio transmembranario de anclaje es un dominio transmembranario seleccionado del grupo que consiste en el dominio transmembranario de CD8, de CD3z, de FCGR3A, de NKG2D, de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 o de DAP12, en particular, en el que el dominio transmembranario de anclaje es el dominio transmembranario de CD28.
3. El receptor de unión a antígeno de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el al menos un dominio de señalización estimulante es el dominio intracelular de CD3z.
4. El receptor de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el al menos un dominio de señalización coestimulante se selecciona individualmente del grupo que consiste en el dominio intracelular de CD27, de CD28, de CD137, de OX40, de ICOS, de DAP10 y de DAP12, en particular, en el que el al menos un dominio de señalización coestimulante es el dominio intracelular de CD28.
5. El receptor de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el receptor de unión a antígeno comprende un dominio de señalización estimulante que comprende el dominio intracelular de CD28, y en el que el receptor de unión a antígeno comprende un dominio de señalización coestimulante que comprende el dominio intracelular de CD3z.
6. El receptor de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fragmento scFv se conecta en el extremo C al extremo N del dominio transmembranario de anclaje a través de un conector peptídico.
7. El receptor de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el resto de unión a antígeno comprende:
 - (i) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende
 - (a) la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR H) 1 RYWMN (SEQ ID NO: 1);
 - (b) la secuencia de aminoácidos de CDR H2 EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 2); y
 - (c) la secuencia de aminoácidos de CDR H3 PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3); y
 - (ii) una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende
 - () la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (CDR L) 1 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4);
 - (d) la secuencia de aminoácidos de CDR L2 GTNKRAP (SEQ ID NO: 5); y
 - (e) la secuencia de aminoácidos de CDR L3 ALWYSNTIWV (SEQ ID NO: 6).
8. Un linfocito T transducido que puede expresar el receptor de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un polinucleótido aislado que codifica el receptor de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Un vector, en particular, un vector de expresión, que comprende el polinucleótido de la reivindicación 9.
11. Un linfocito T transducido que puede expresar el receptor de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

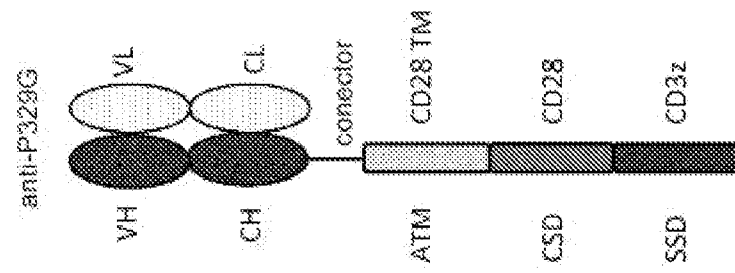
12. Un kit que comprende
 - (A) un linfocito T transducido que puede expresar el receptor de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
 - (B) un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado, en el que el dominio Fc mutado es un dominio Fc de IgG1 humana que comprende solo las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G.
13. Un kit que comprende
 - (A) un polinucleótido aislado que codifica el receptor de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
 - (B) un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado, en el que el dominio Fc mutado es un dominio Fc de IgG1 humana que comprende solo las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G.
14. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en el que el anticuerpo que comprende el dominio Fc mutado se puede unir específicamente a un antígeno expresado sobre la superficie de una célula tumoral.
15. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el anticuerpo que comprende el dominio Fc mutado se puede unir específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP), antígeno carcinoembrionario (CEA), mesotelina (MSLN), CD20, receptor de folato 1 (FOLR1) y tenascina (TNC).
16. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 para su uso como medicamento.
17. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15 para su uso en el tratamiento de una neoplasia maligna.
18. El linfocito T transducido de la reivindicación 11 para su uso como medicamento, en el que el linfocito T transducido de la reivindicación 11 se administra en combinación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado, en el que el dominio Fc mutado es un dominio Fc de IgG1 humana que comprende solo las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G, y en el que el linfocito T transducido se administra antes de, simultáneamente con o después de la administración del anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado.
19. El linfocito T transducido de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de una neoplasia maligna, en el que el tratamiento comprende la administración del linfocito T transducido de la reivindicación 11 en combinación con un anticuerpo que se puede unir específicamente a un antígeno expresado sobre la superficie de una célula tumoral que comprende un dominio Fc mutado, en el que el dominio Fc mutado es un dominio Fc de IgG1 humana que comprende solo las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G, y en el que el linfocito T transducido se administra antes de, simultáneamente con o después de la administración del anticuerpo que comprende un dominio Fc mutado.

Figura 1A



Formato scFv

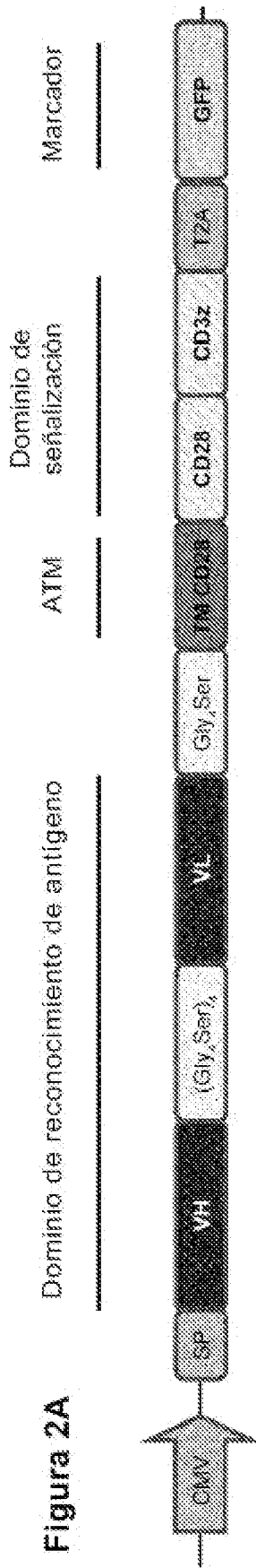
Figura 1B



Formato Fab

ATM = dominio transmembranario de anclaje
 CSD = dominio de señalización coestimuladora
 SSD = dominio de señalización estimuladora

Figura 2A



CMV = promotor del citomegalovirus
SP = péptido señal
VH = cadena pesada variable
VL = cadena ligera variable
TM = dominio transmembranario
IRES = sitio interno de entrada ribosomal

Figura 2B

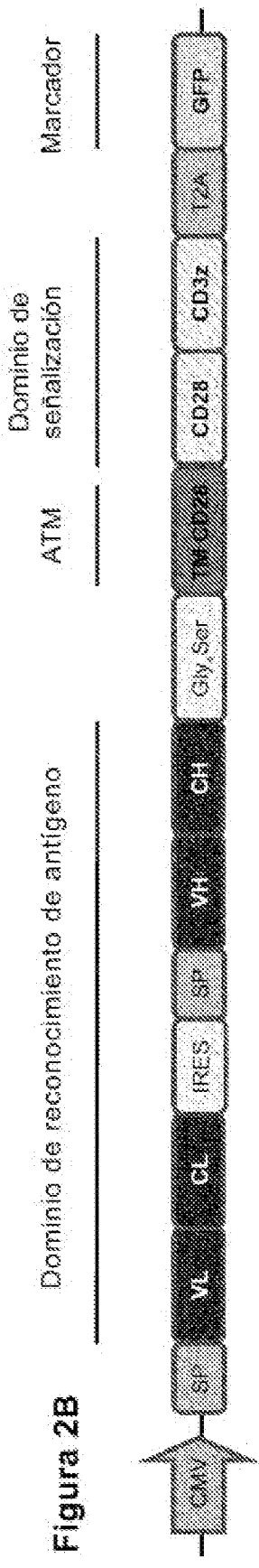
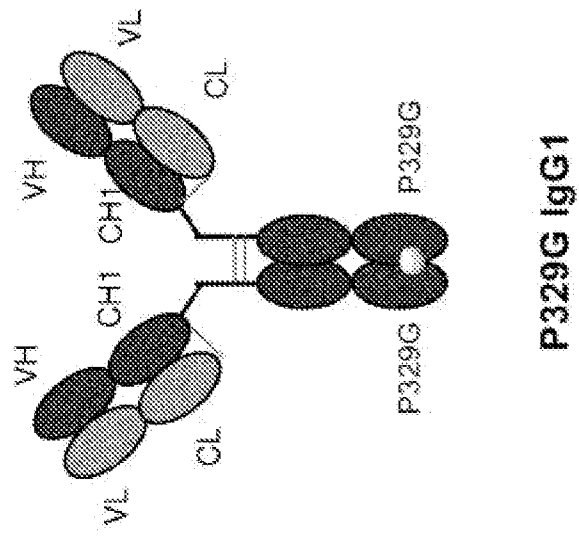


Figura 3



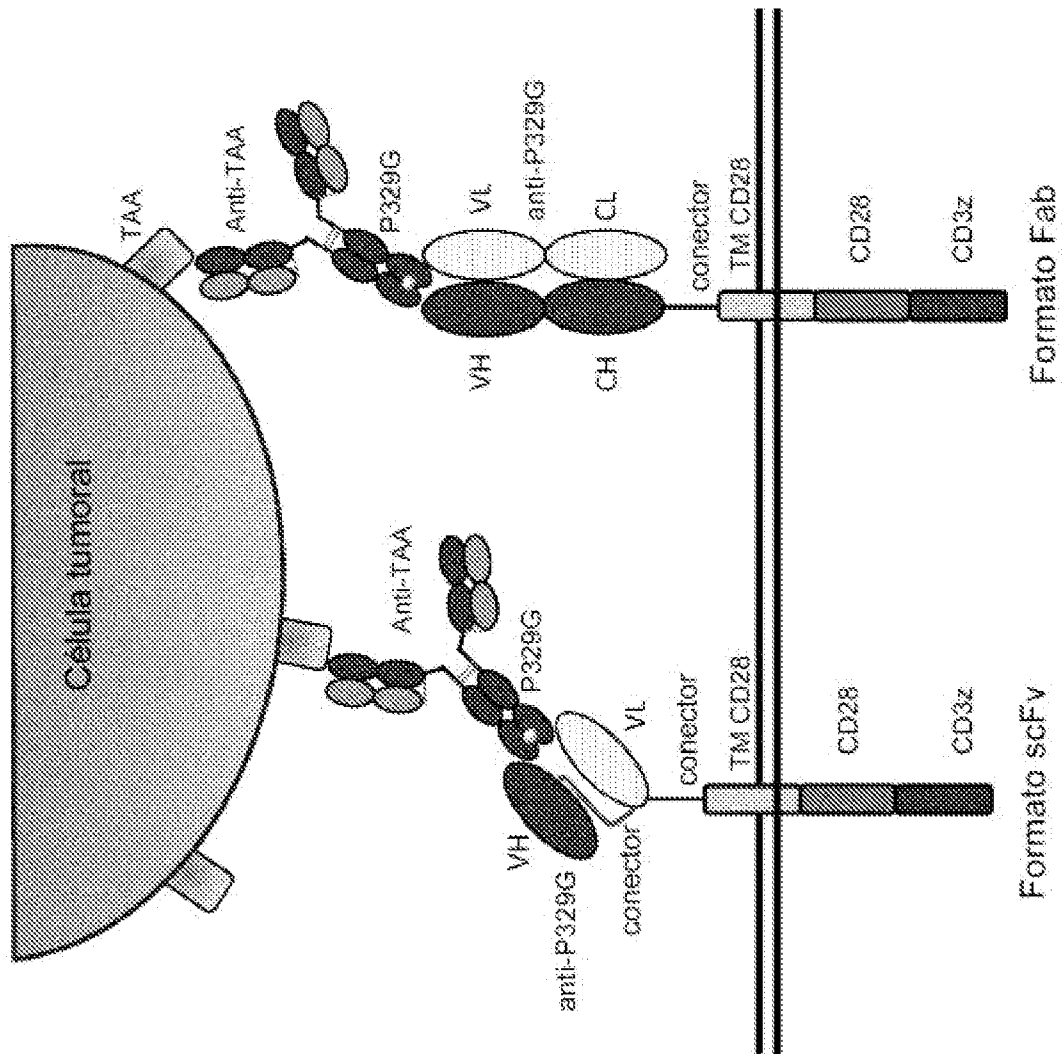


Figura 4

Figura 5

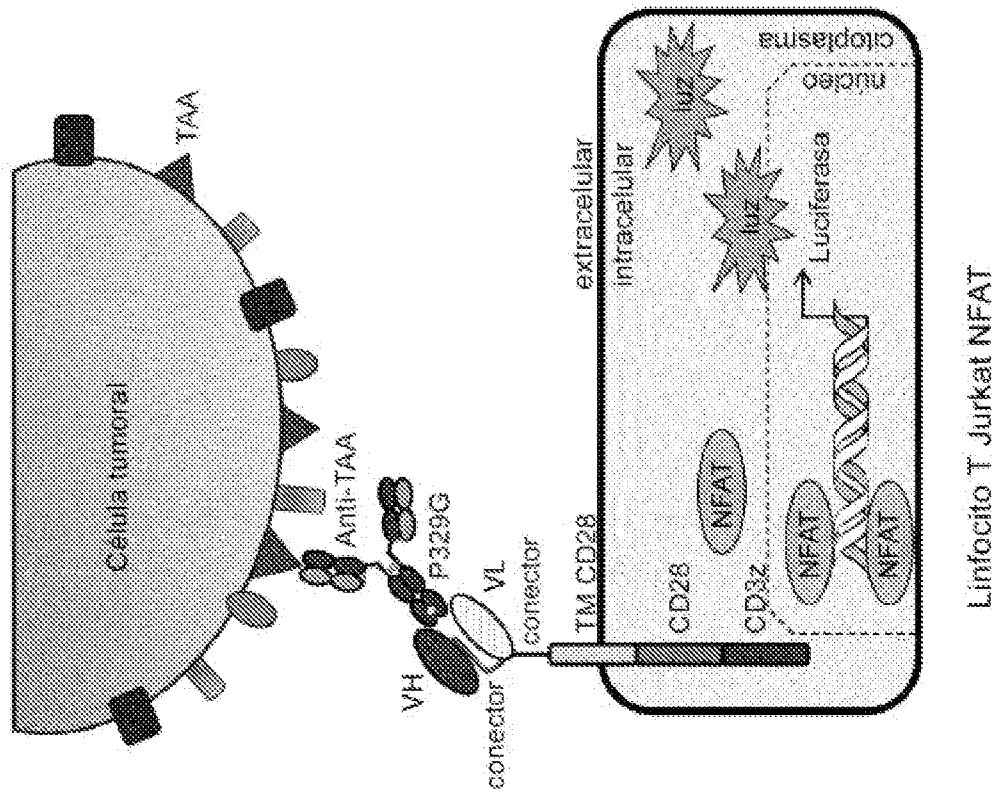


Figura 6A población de linfocitos T Jurkat NFAT anti-P329G-ds-Fab
(valor de referencia corregido)

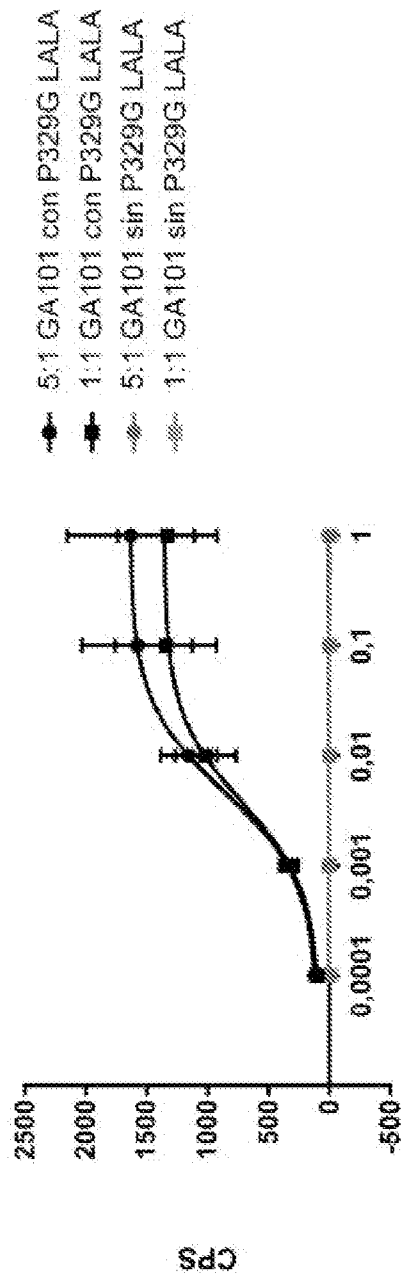


Figura 6B población de linfocitos T Jurkat NFAT anti-P329G-ds-scFv
(valor de referencia corregido)

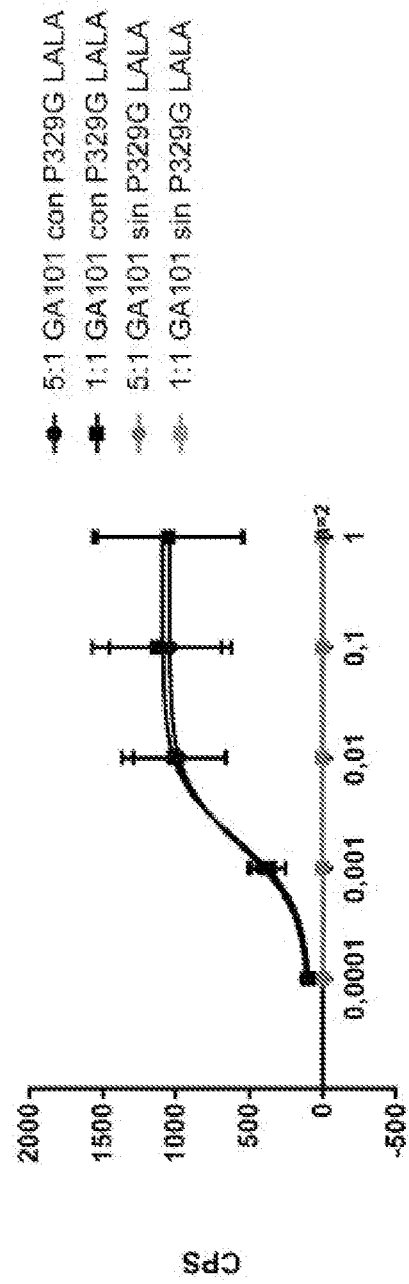


Figura 7A

Clon 5 linfocitos T Jurkat NFAT anti-P329G-ds-Fab
WSUDLCL2

(valor de referencia corregido)

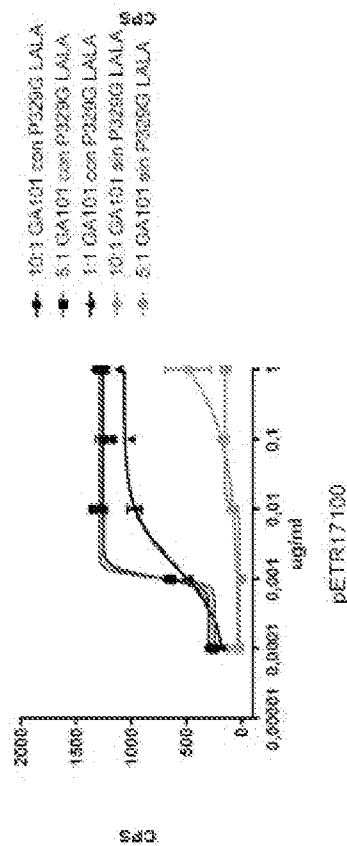


Figura 7B

Clon 2 linfocitos T Jurkat NFAT anti-P329G-ds-Fab
WSUDLCL2

(valor de referencia corregido)

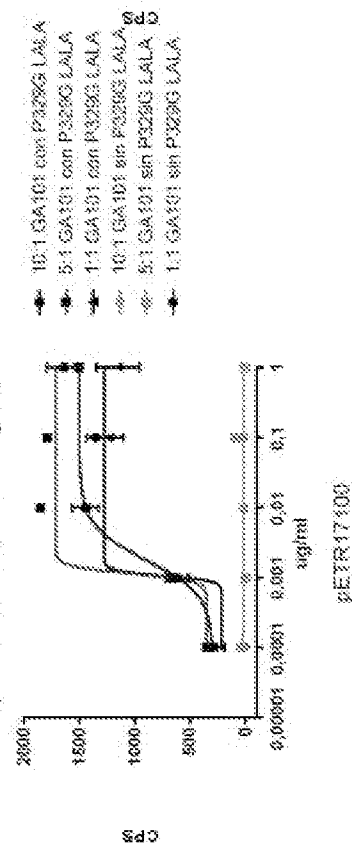


Figura 7C

Clon 5 linfocitos T Jurkat NFAT anti-P329G-ds-Fab
SUDHL4

(valor de referencia corregido)

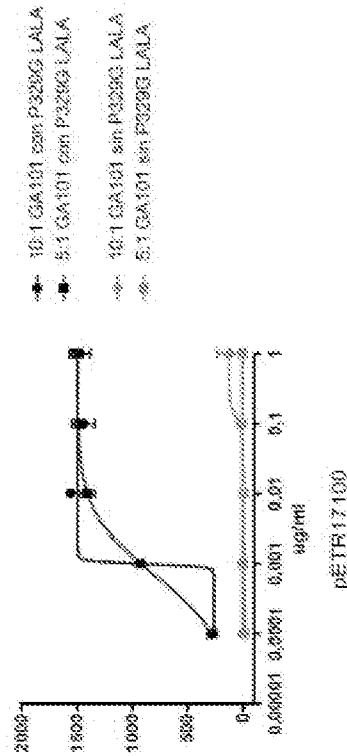


Figura 7D

Clon 2 linfocitos T Jurkat NFAT anti-P329G-ds-Fab
SUDHL4

(valor de referencia corregido)

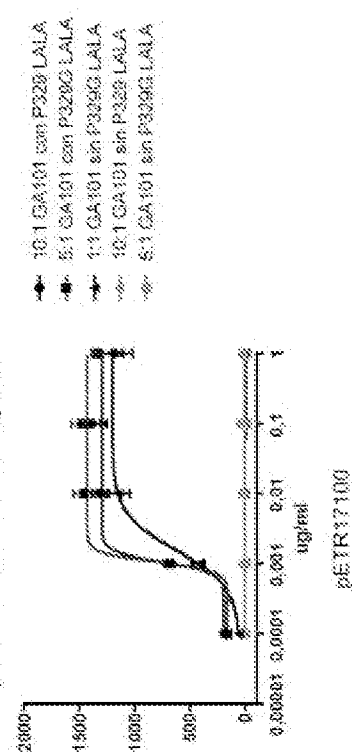


Figura 8A

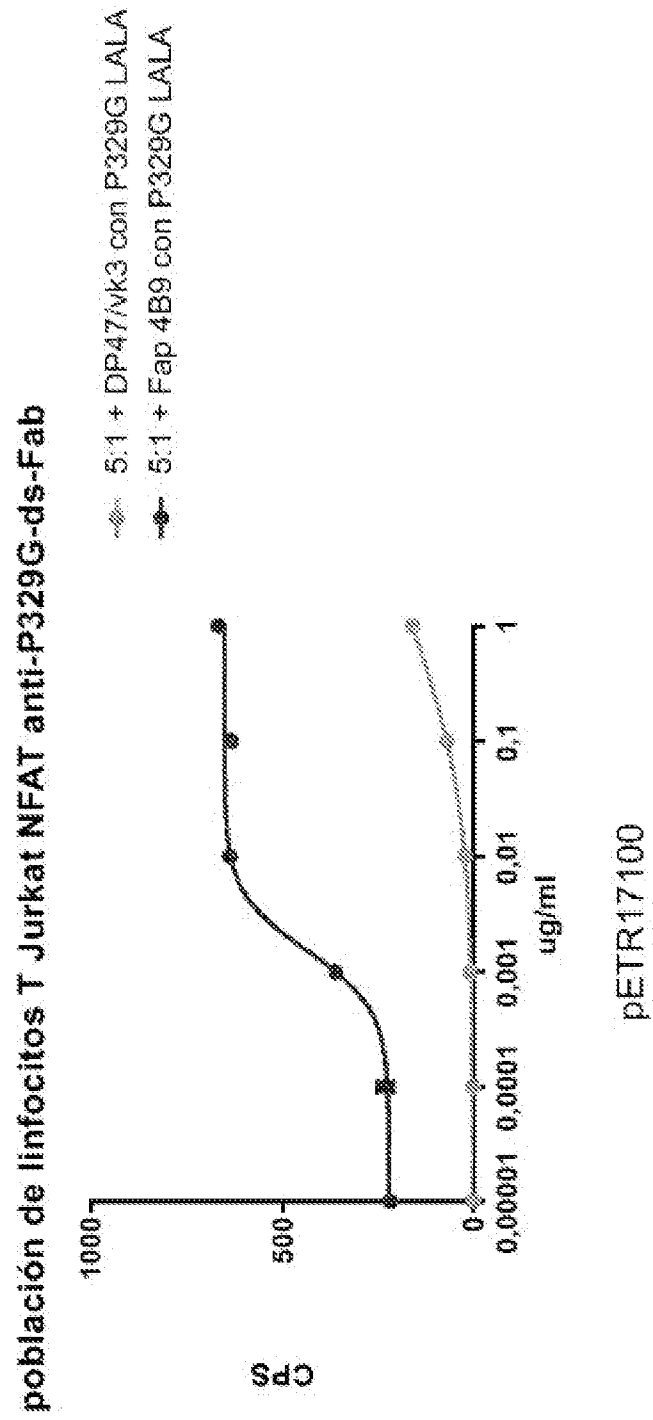


Figura 8B

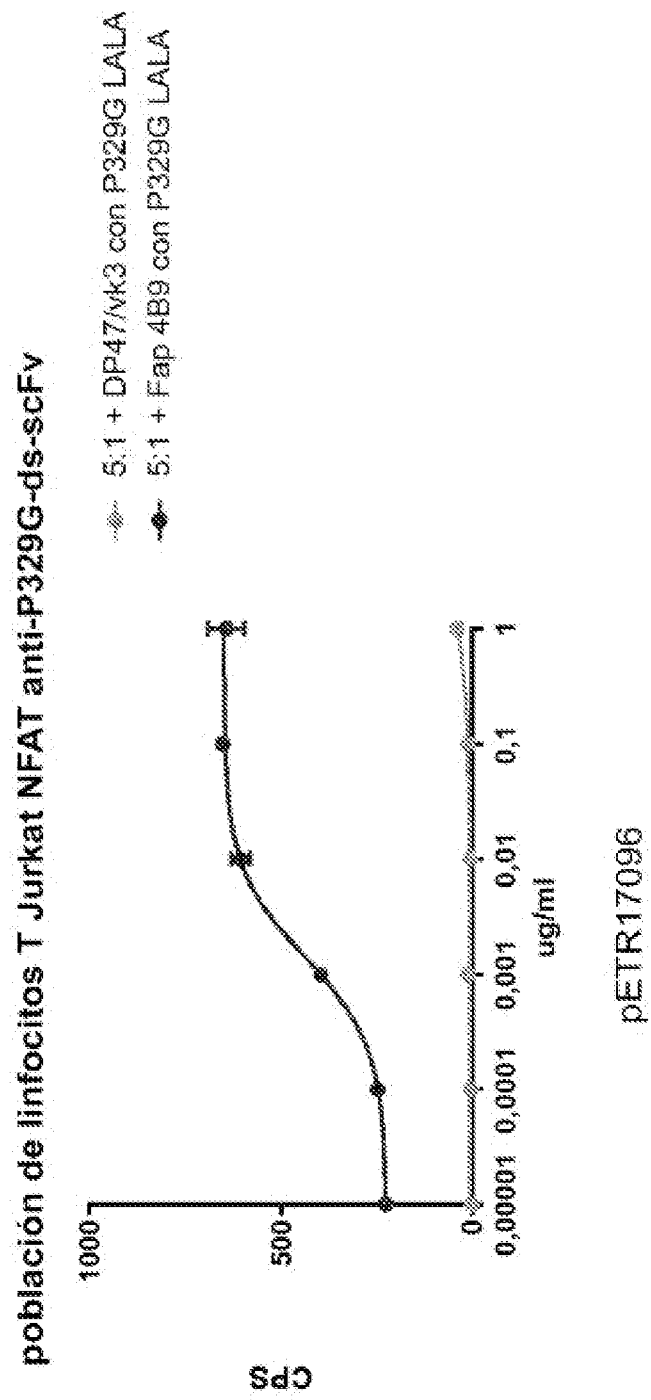


Figura 8C

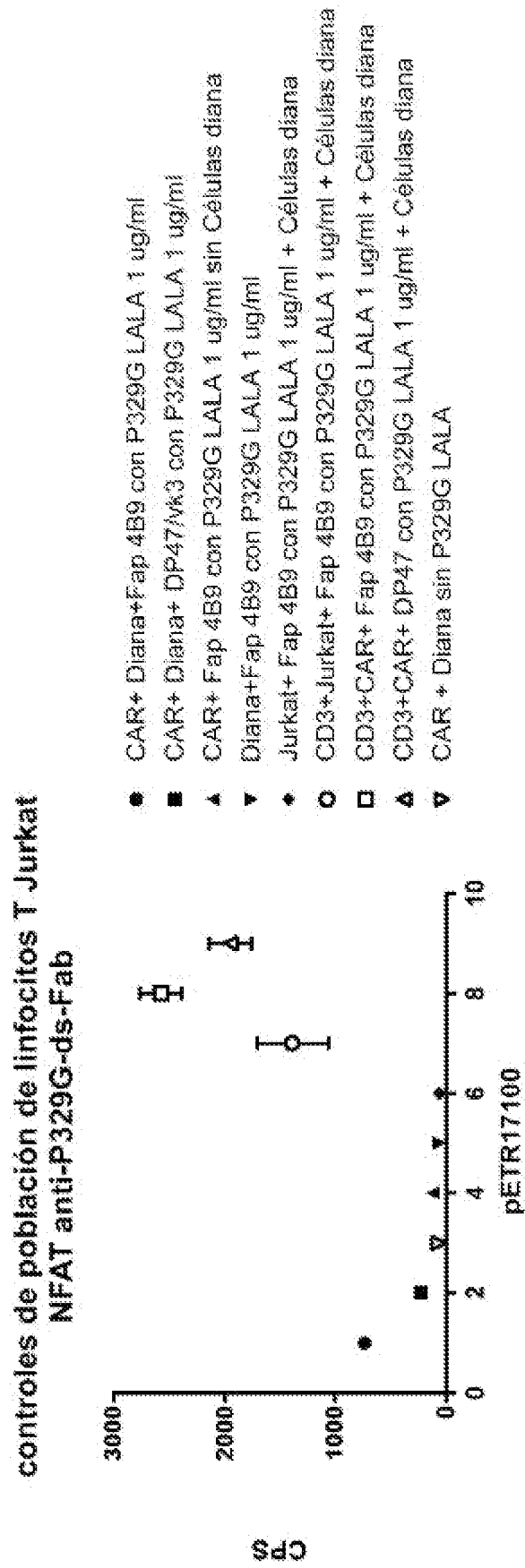


Figura 8D

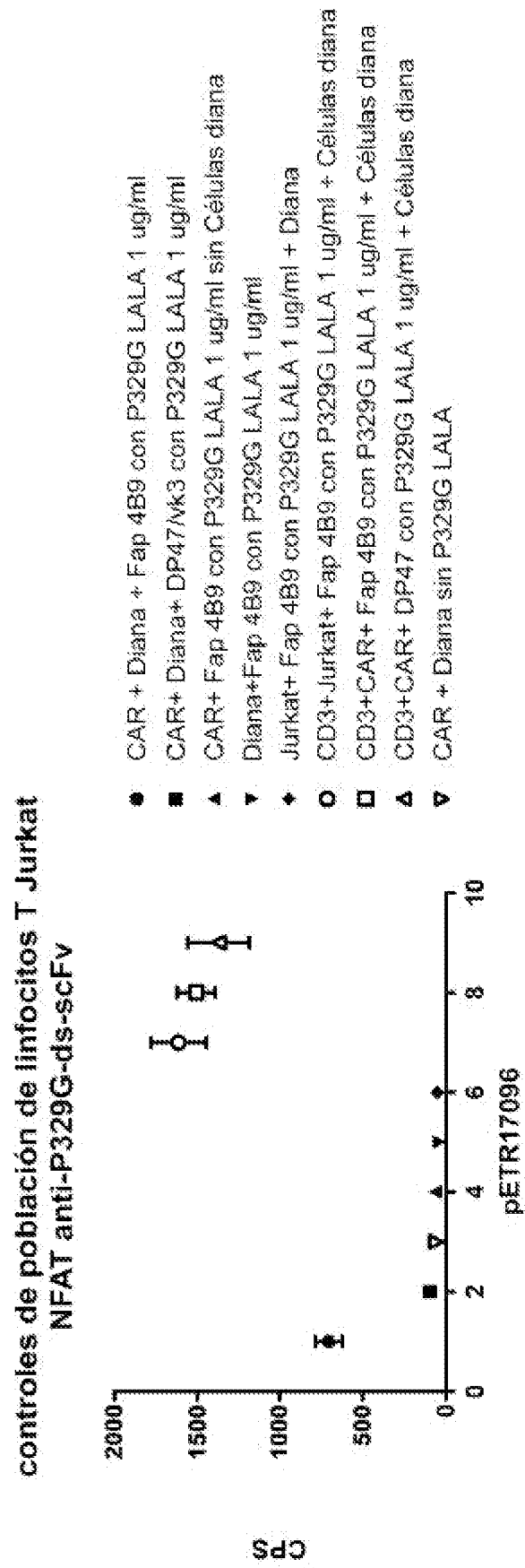


Figura 9A

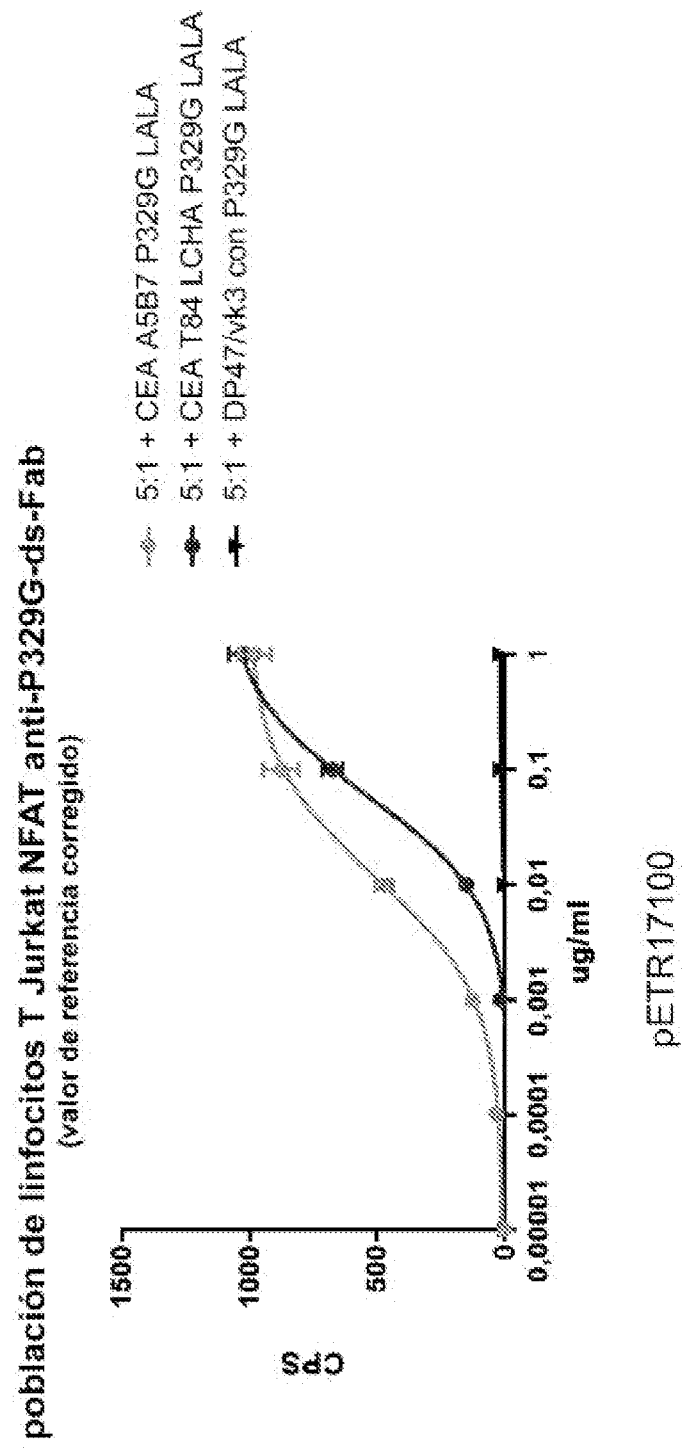


Figura 9B

controles de población de linfocitos T Jurkat NFAT anti-P329G-ds-Fab

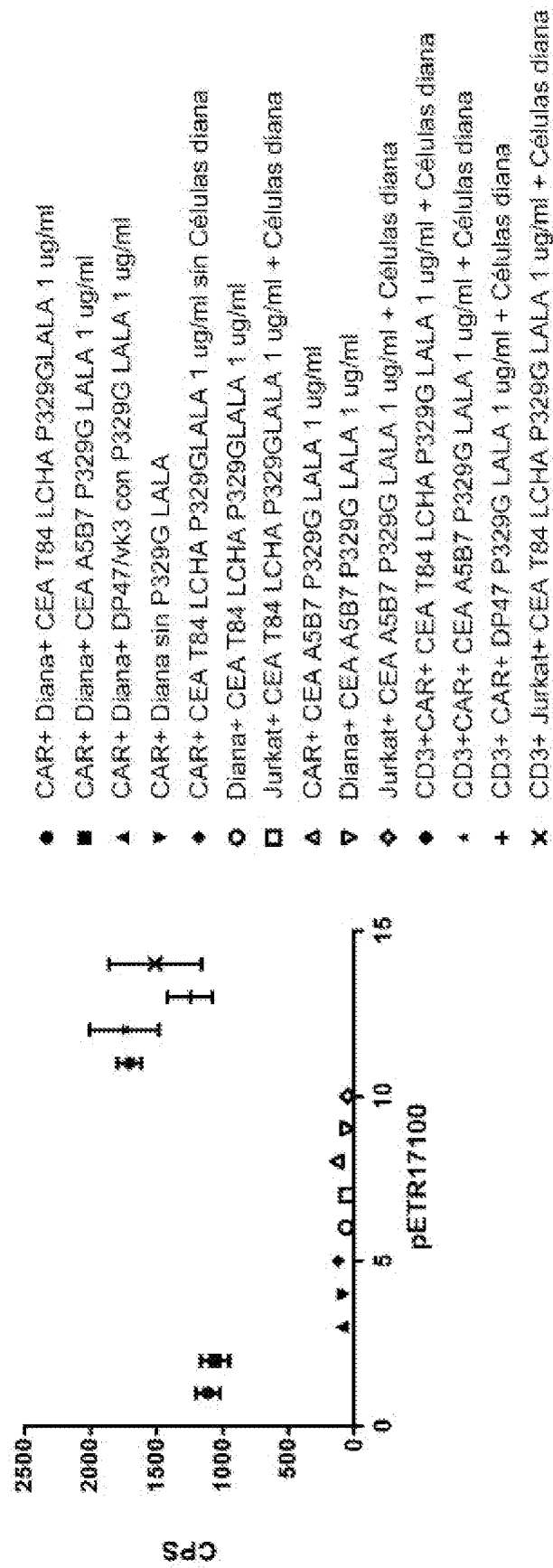


Figura 9C

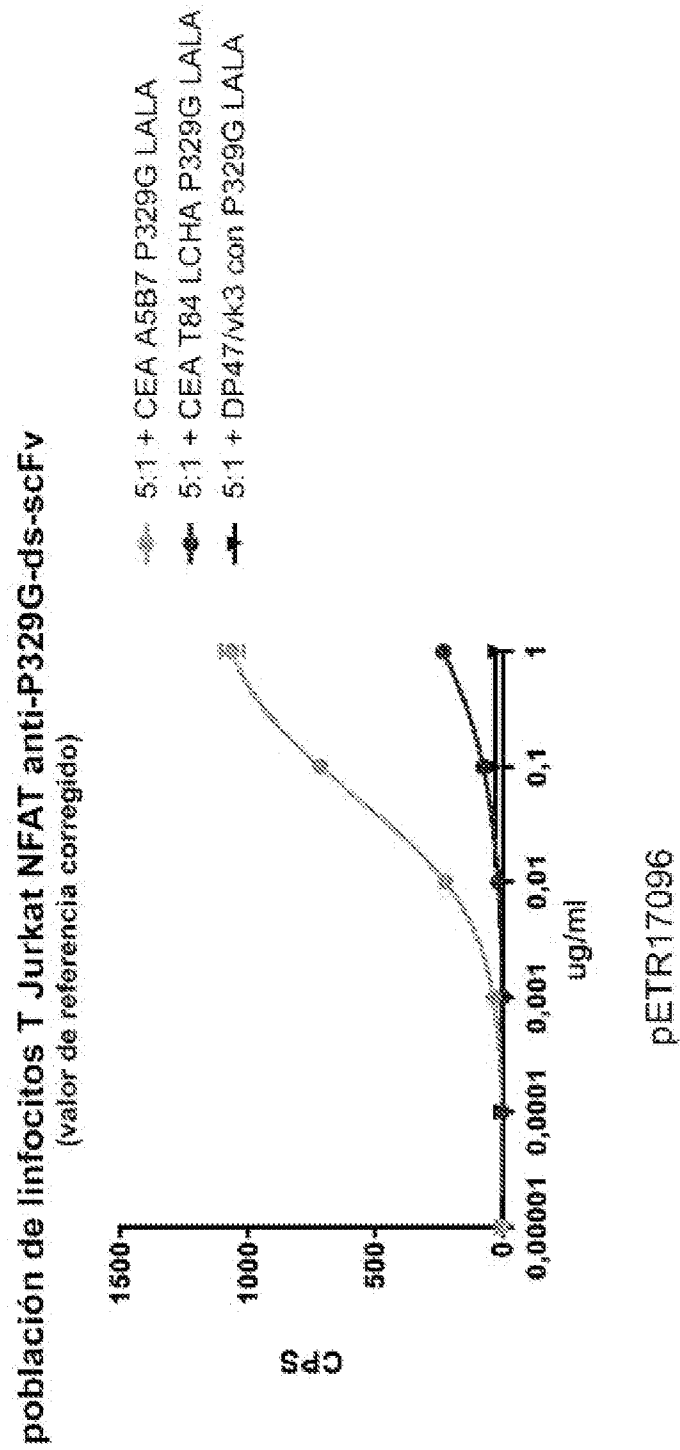


Figura 9D

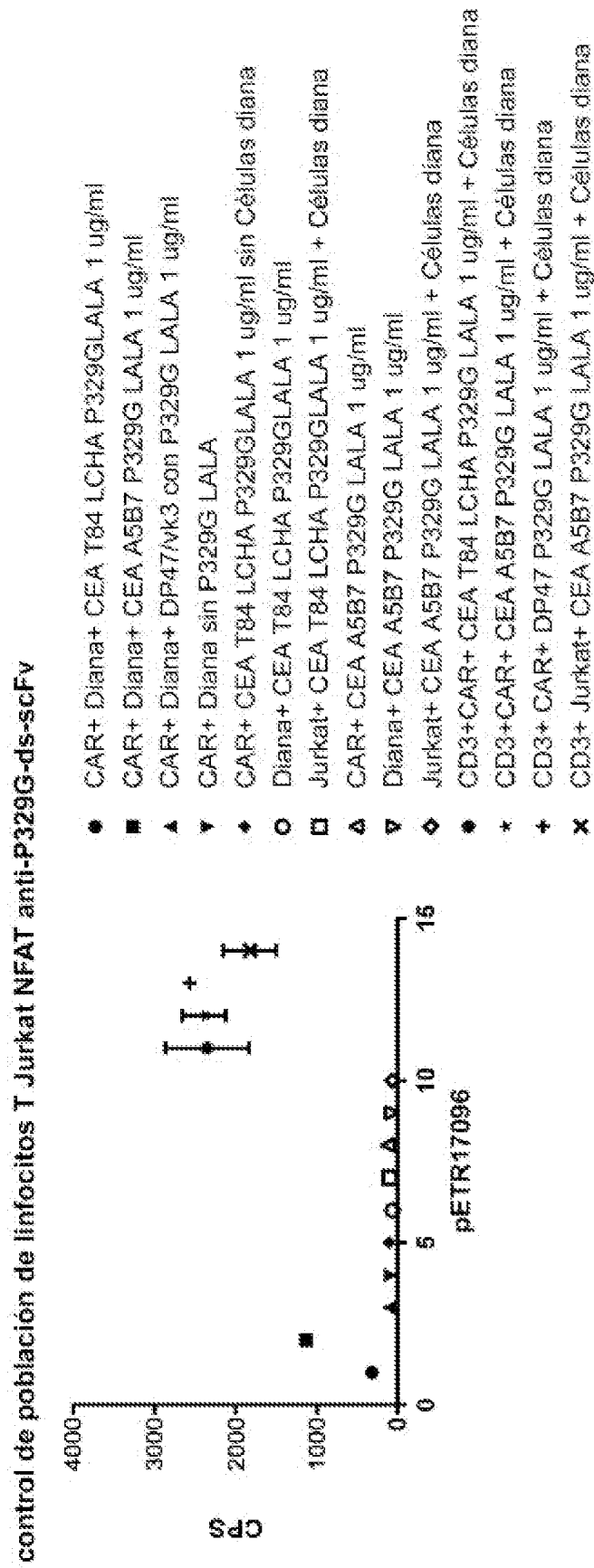


Figura 10A

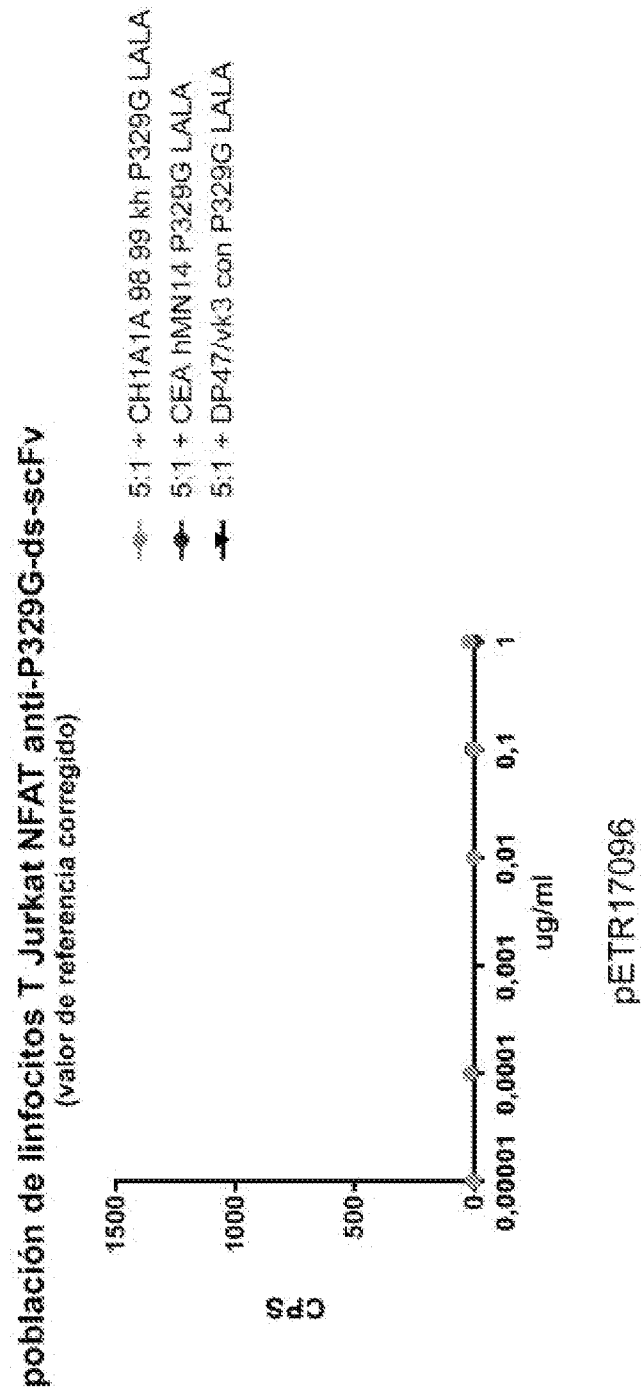


Figura 10B

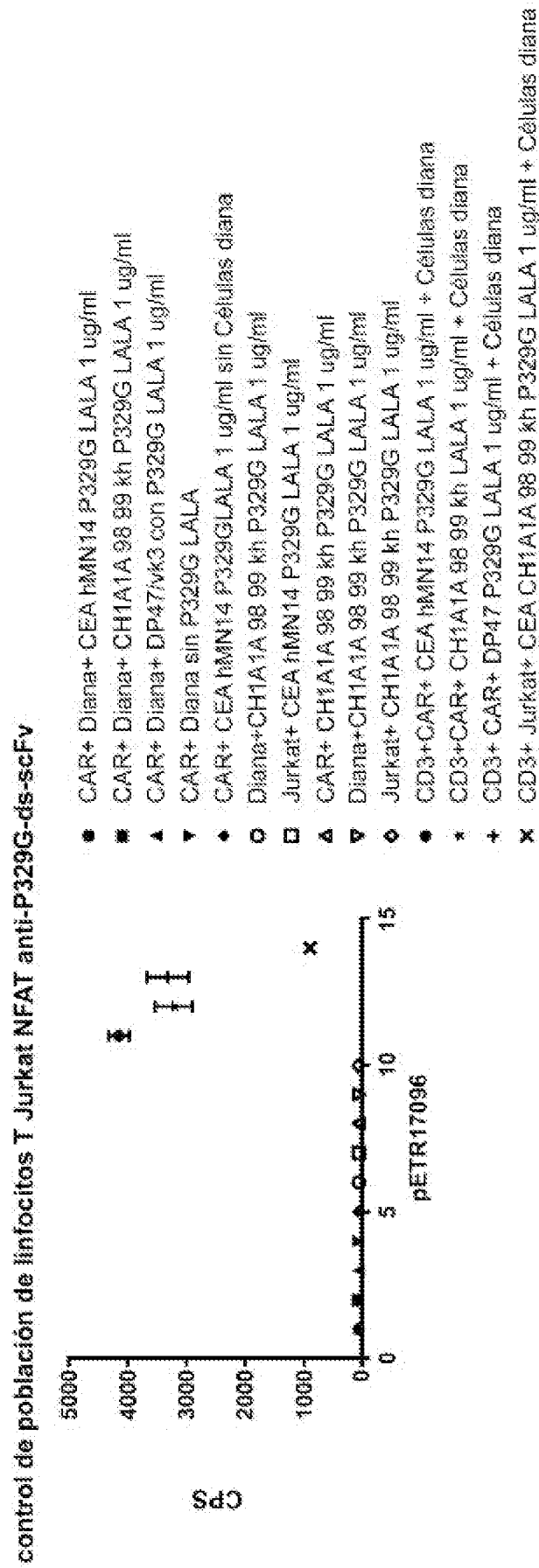


Figura 10C

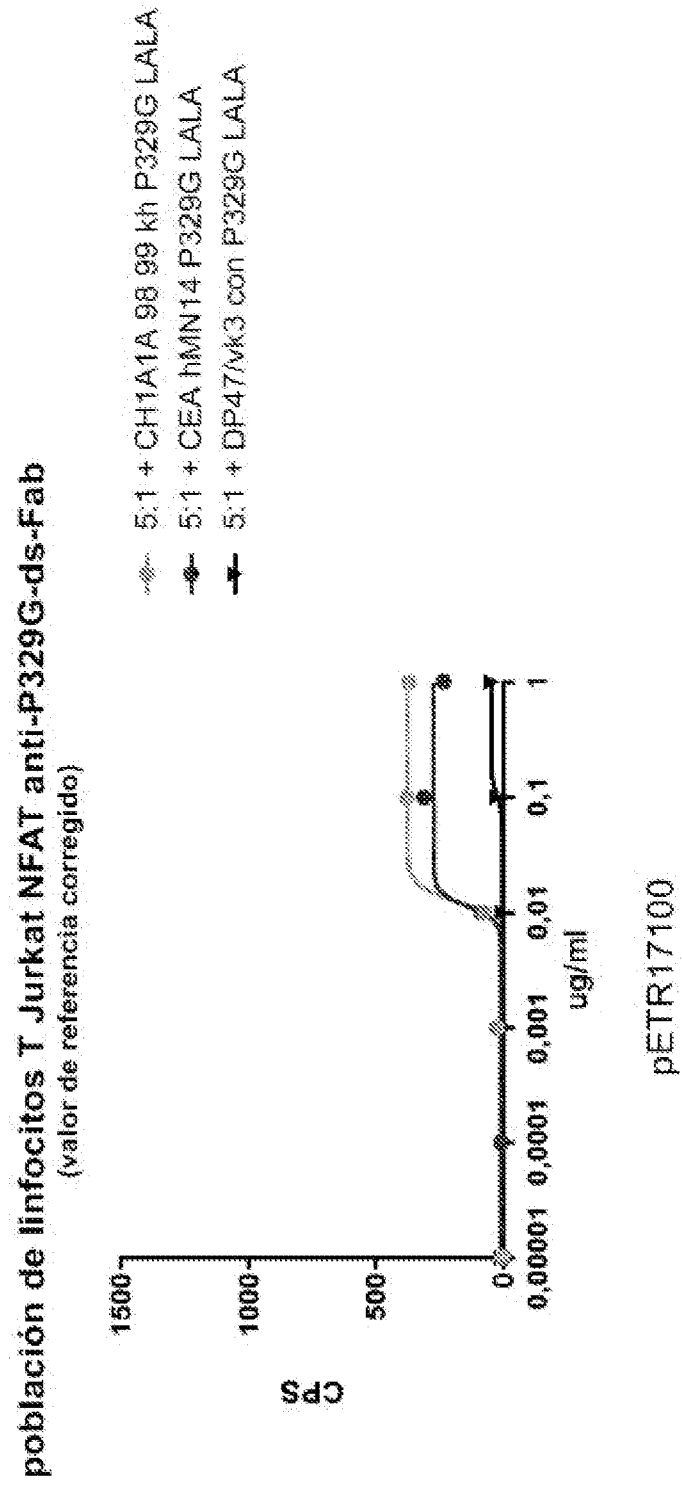


Figura 10D

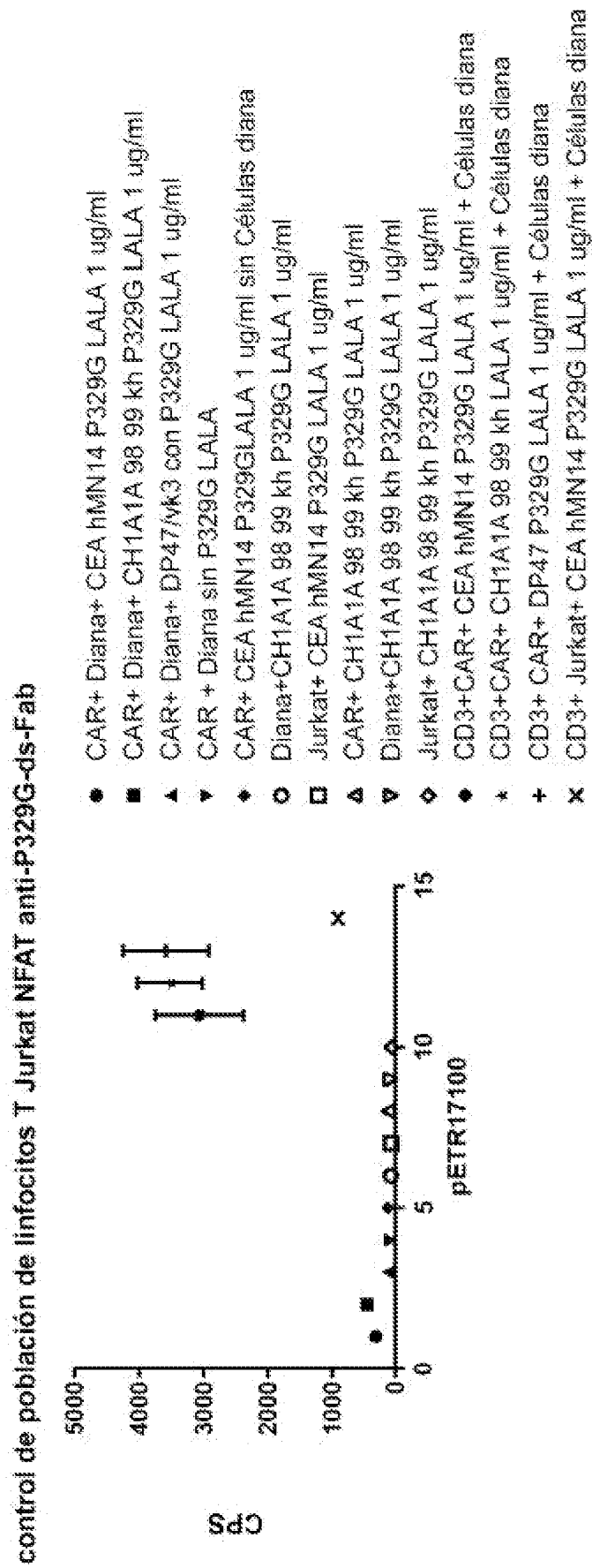


Figura 11A

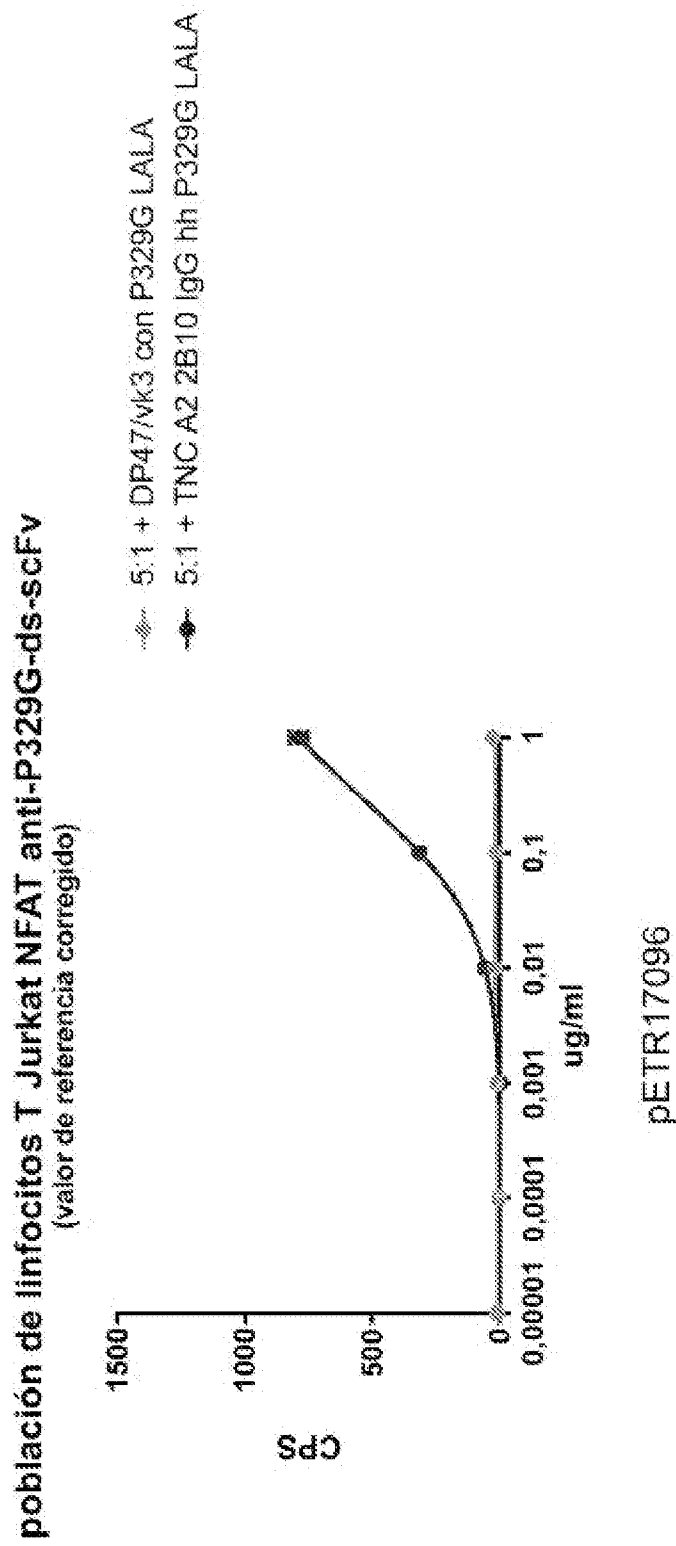


Figura 11B

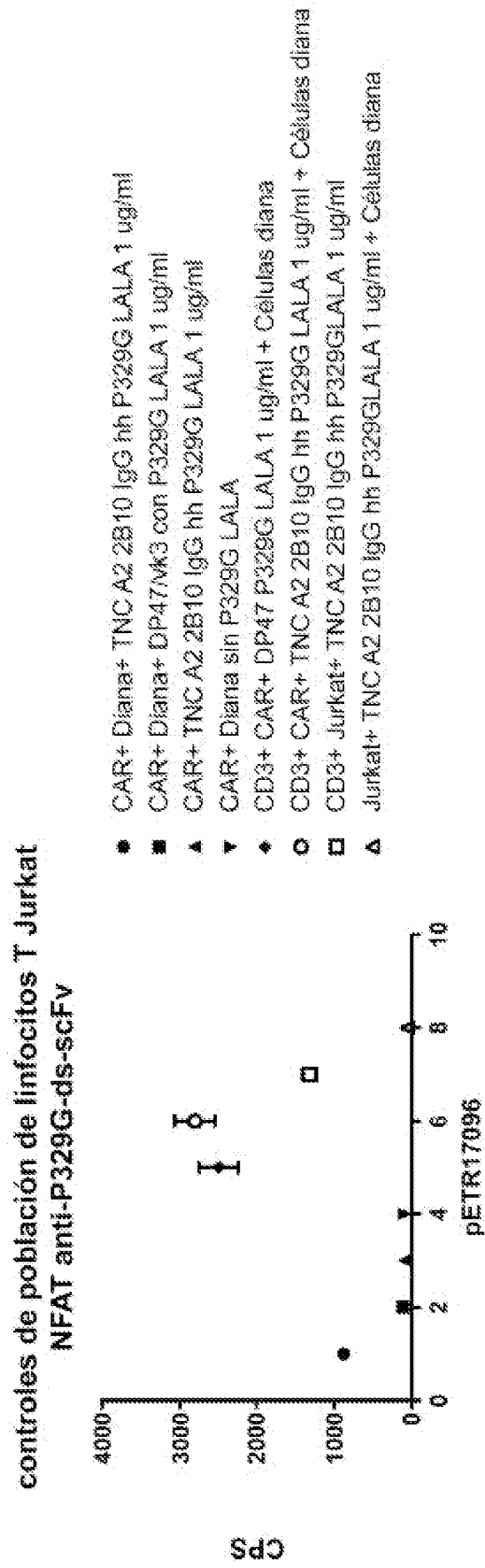


Figura 11C

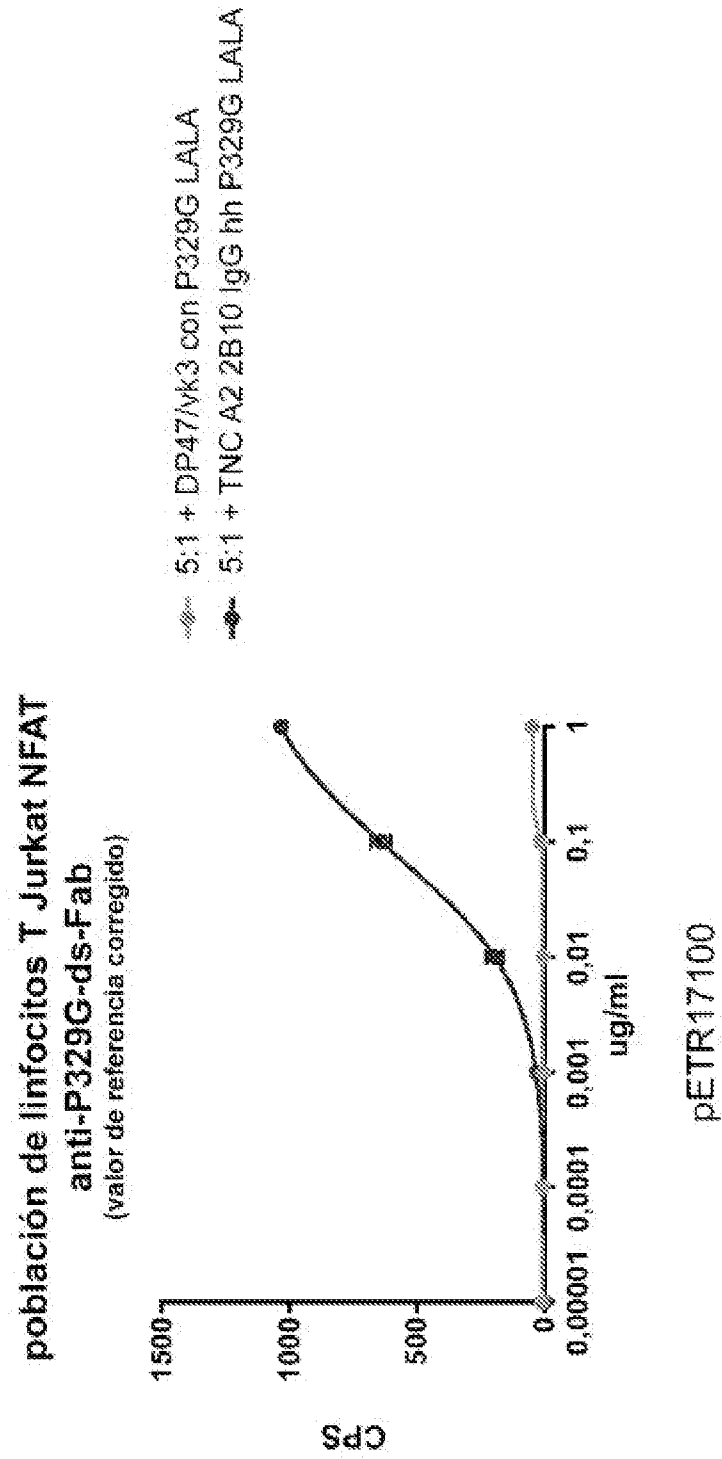


Figura 11D

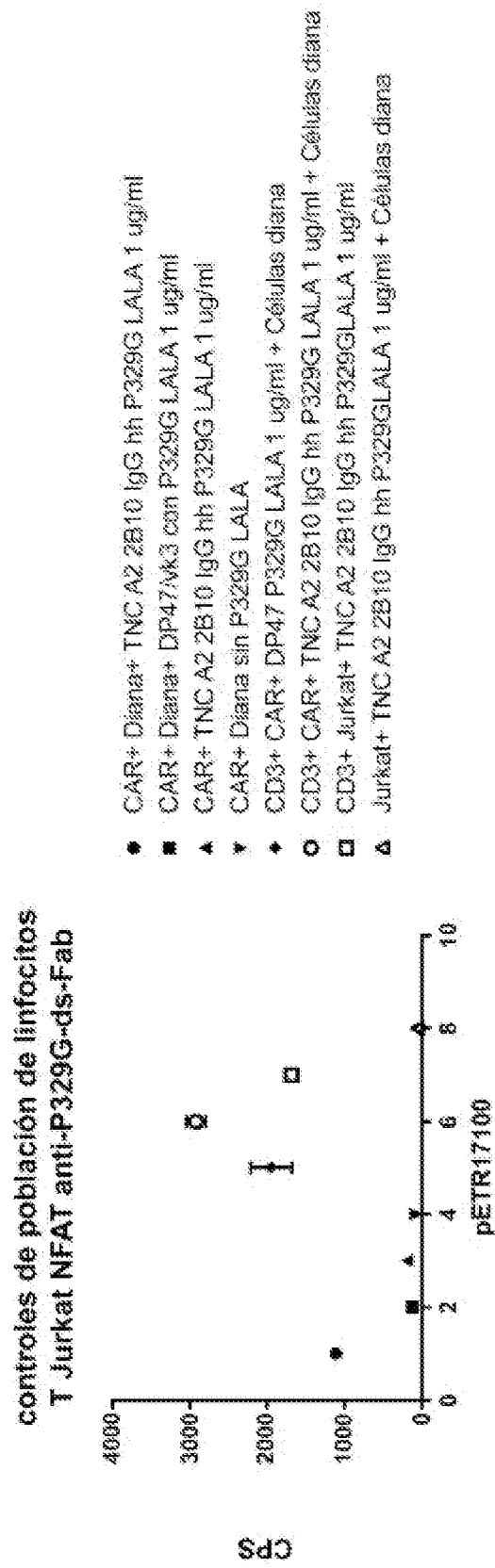


Figura 12A

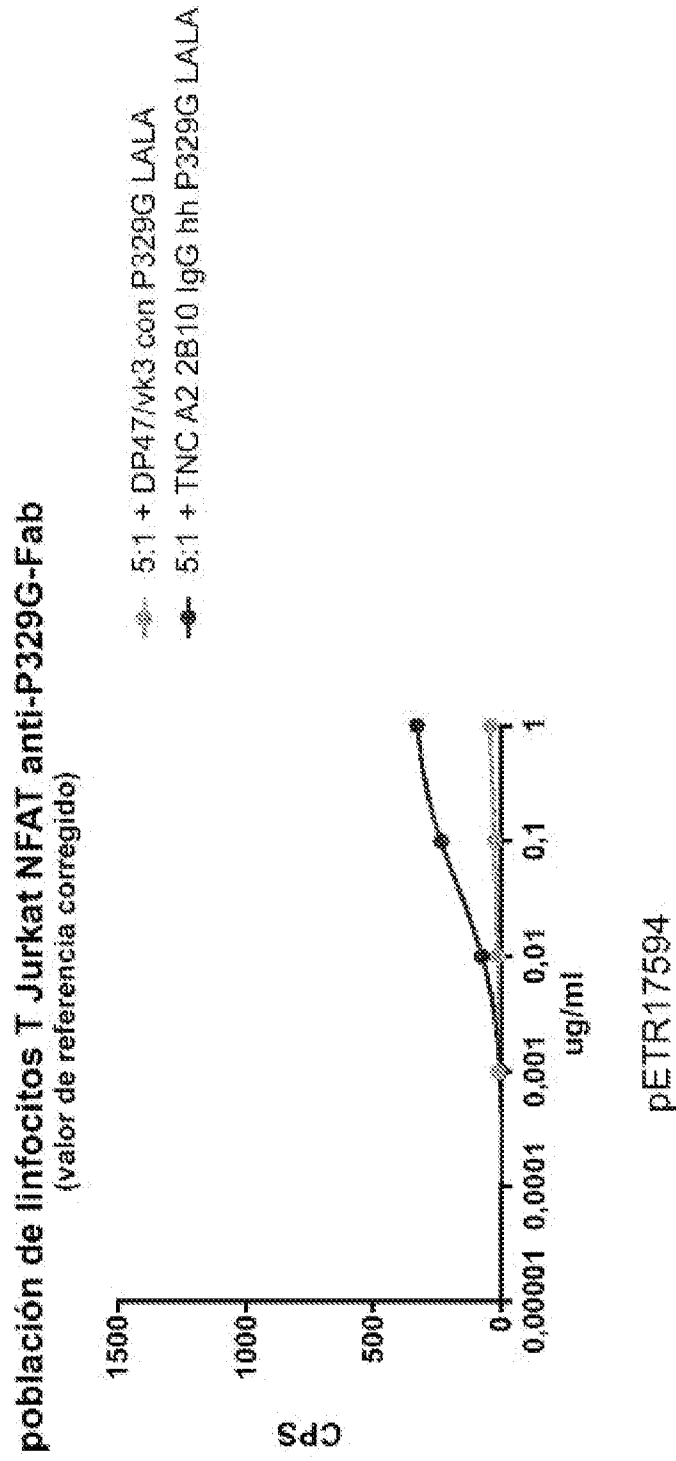


Figura 12B

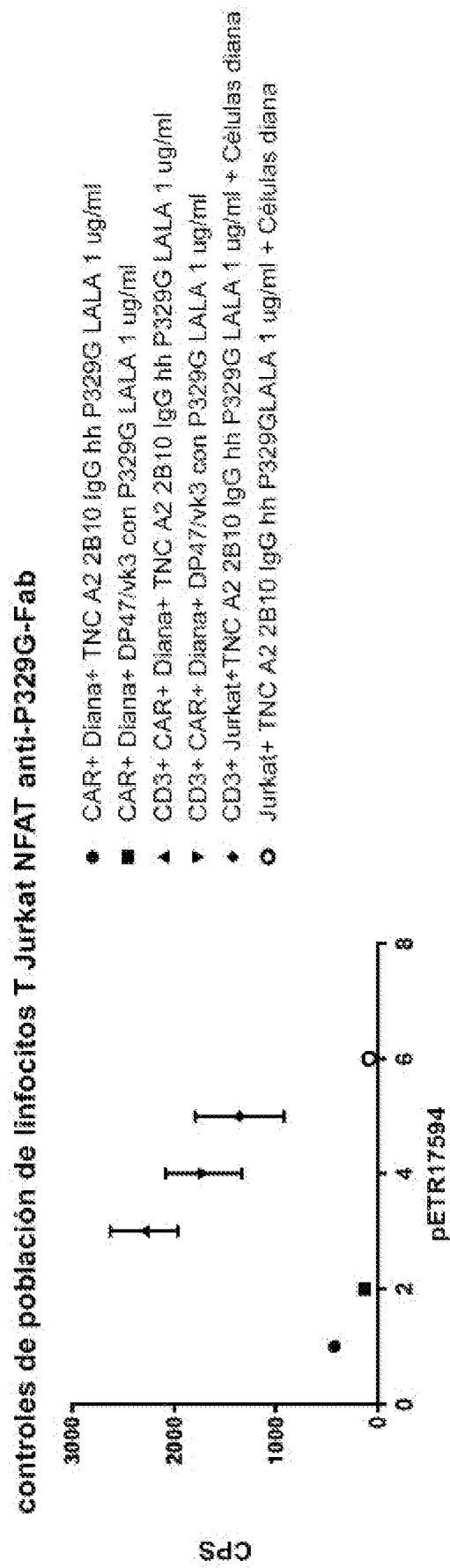


Figura 13A

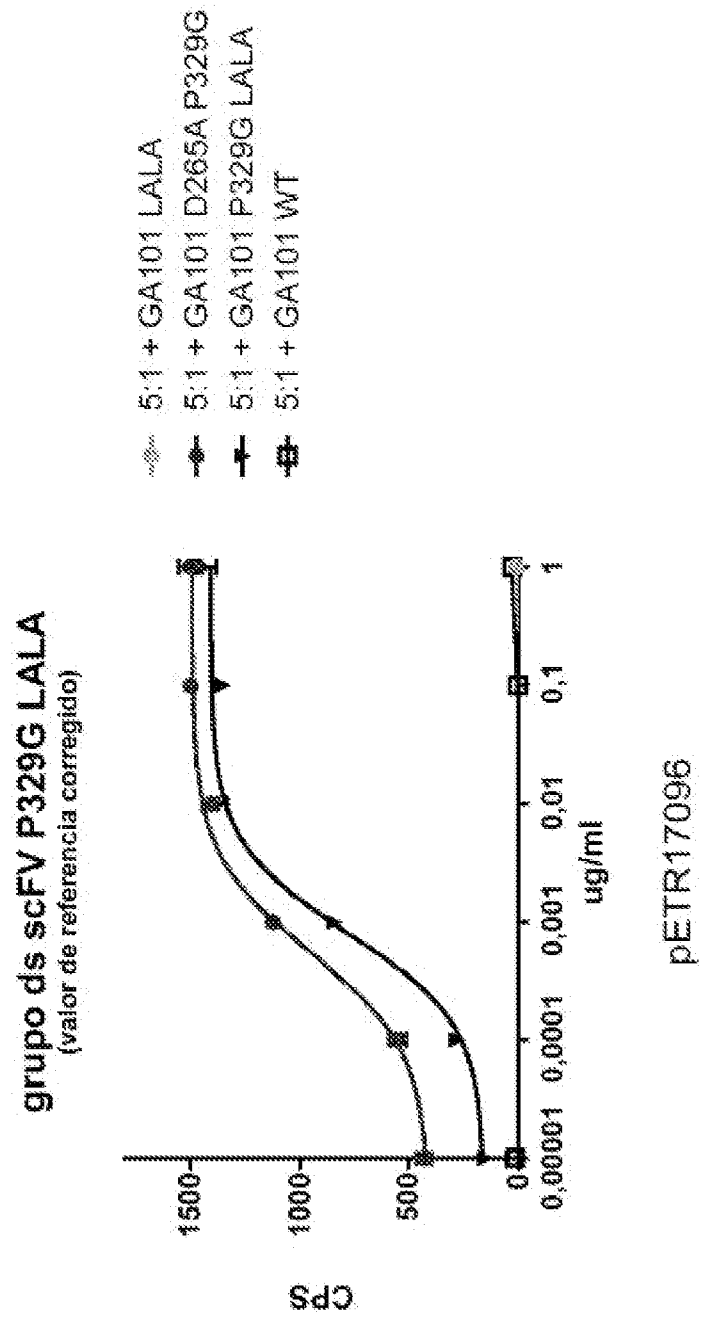


Figura 13B

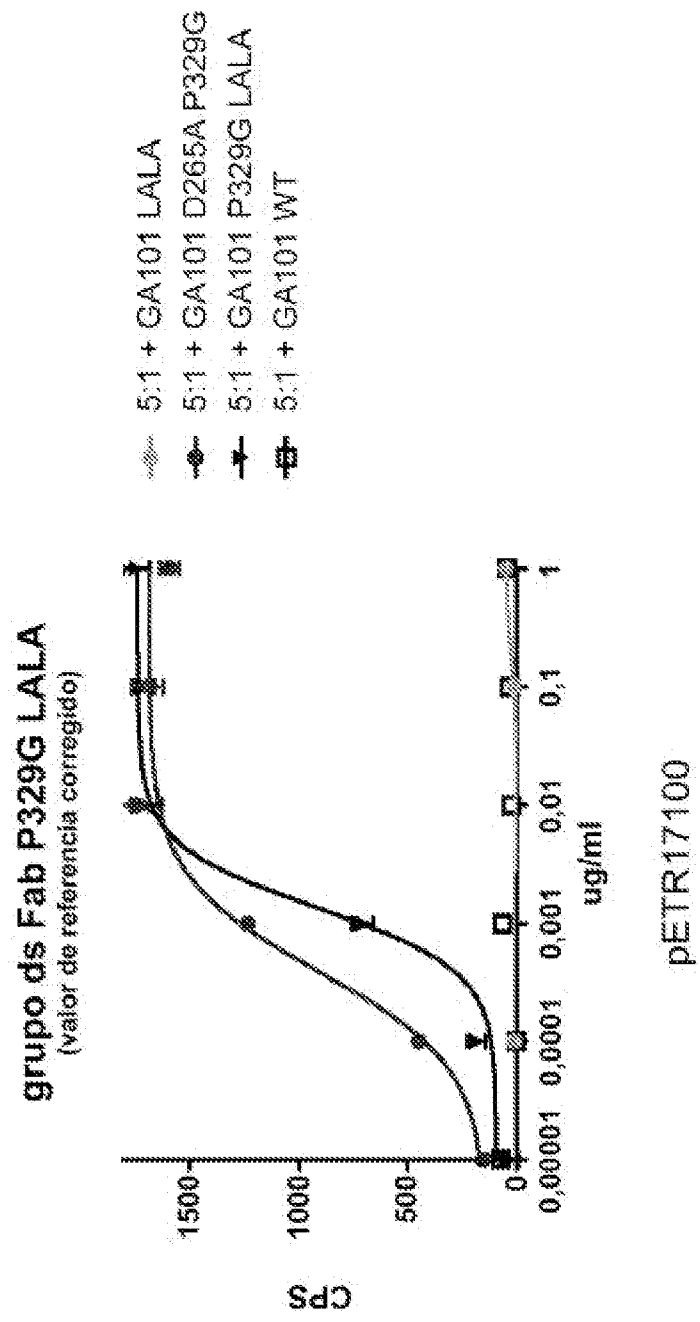


Figura 14A

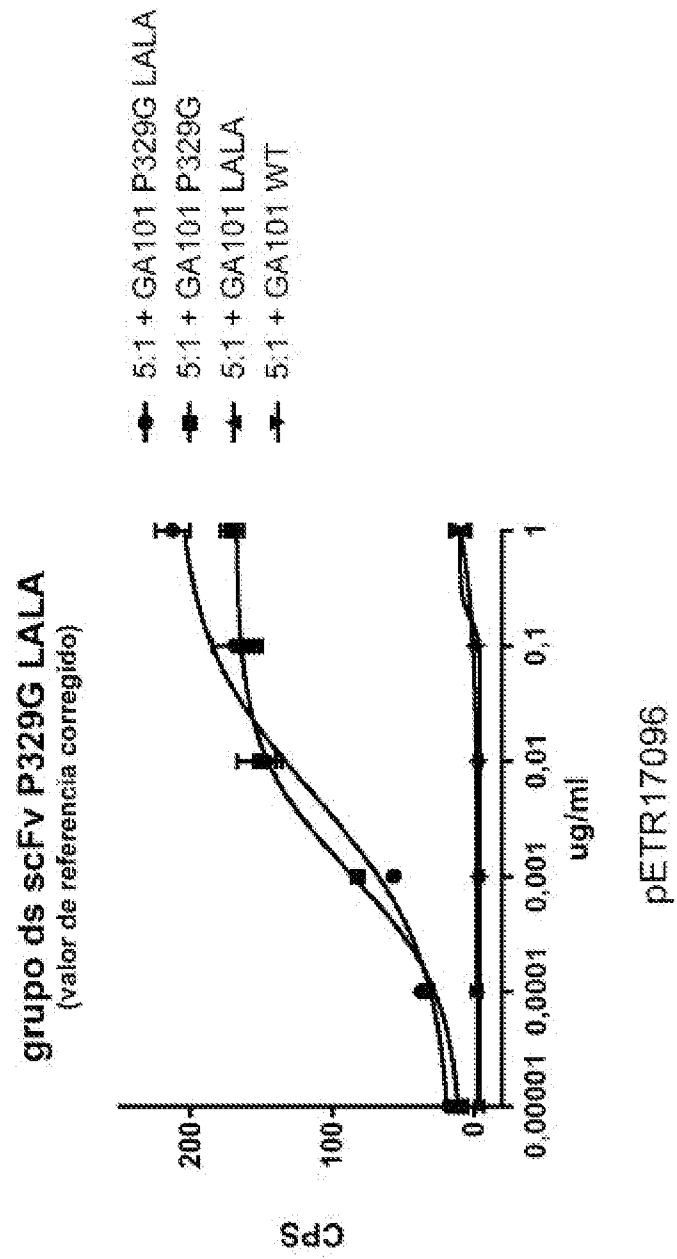


Figura 14B

