

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 737**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2018** **PCT/US2018/024916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2018** **WO18183551**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2018** **E 18721192 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024** **EP 3601330**

54 Título: **Polipéptidos quiméricos y métodos para alterar la localización de la membrana de los mismos**

30 Prioridad:

28.03.2017 US 201762477733 P
16.11.2017 US 201762587262 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2025

73 Titular/es:

CELL DESIGN LABS, INC. (100.00%)
5858 Horton Street, Suite 240
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es:

SANTORO, STEPHEN;
COYLE, SCOTT;
RUPP, LEVI y
EMTAGE, PETER

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 996 737 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

Polipéptidos quiméricos y métodos para alterar la localización de la membrana de los mismos

5 REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de EE. UU. con número de serie 62/477,733, presentada el 28 de marzo de 2017, y la solicitud de patente provisional de EE. UU. con número de serie 62/587,262, presentada el 16 de noviembre de 2017.

10

CAMPO TÉCNICO

La presente divulgación se refiere al campo de la biotecnología, y más específicamente, a la regulación de la localización celular de un polipéptido quimérico.

15

ANTECEDENTES

Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) son una subclase de polipéptidos de cadenas únicas y multicadenas. Los receptores de antígenos quiméricos suelen incluir, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, un dominio coestimulador y un CD3 u otro dominio de señalización. Se han investigado los CAR para su uso en el tratamiento clínico de diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, cánceres hematológicos, en mamíferos, con un éxito considerable. Sin embargo, un factor limitante ha sido la toxicidad incontrolable asociada con la actividad anticancerígena del CAR.

20

Los receptores de hormonas nucleares son una clase de polipéptidos que incluyen varios dominios, incluido un motivo de unión al ADN y un dominio de unión al ligando. En ausencia de ligando, los receptores hormonales nucleares naturales se asocian con varias chaperonas y otras proteínas interactuantes que secuestran al receptor hormonal nuclear fuera del núcleo. La unión del ligando induce cambios en la conformación del receptor de hormonas nucleares y en los socios de interacción y permite la translocación nuclear y la activación o represión transcripcional de genes diana de hormonas nucleares. Si bien la visión clásica de la señalización de esteroides sostiene que estas hormonas se unen a receptores intracelulares que actúan como factores de transcripción activados por ligando, se ha informado que los esteroides también pueden actuar mediante un mecanismo no genómico en la superficie celular.

25

Constantinescu (2001) (PNAS 98(8):4379-4384) describe el reemplazo del dominio TM de EpoR por el del receptor de prolactina y las propiedades de la proteína recombinante resultante. El documento W02015/142661 proporciona una revisión del estado de la técnica relacionado con los receptores de células CAR-T y analiza el desarrollo de dominios intracelulares de los receptores de células CAR-T y la necesidad de evitar la toxicidad inducida por los receptores de células CAR-T. Este documento sugiere abordar los problemas de toxicidad basándose en interruptores y escisiones de iCasp9. Los interruptores también se mencionan en W02015/142661, W02015/150771 y W02015/017214. Finalmente, W0/2016/138034 describe otro sistema de escisión. Los documentos WO2017120546 y WO2016160791 revelan polipéptidos heterodiméricos condicionalmente activos.

35

40

Sin embargo, ninguno de estos documentos de técnica anterior enseña el polipéptido quimérico de cadena única de la presente invención o sus usos.

45

RESUMEN DE LA INVENCION REIVINDICADA

La presente invención se refiere a un polipéptido quimérico de cadena única, en donde el polipéptido quimérico de cadena única comprende:

50

un dominio de unión a antígeno extracelular;
un dominio transmembrana;
un dominio de señalización intracelular; y
un dominio de unión al ligando del receptor de hormonas,
en donde:

55

el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a 700 aminoácidos; y
el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas no están ambos presentes en el mismo polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero;

60

en donde el dominio transmembrana comprende al menos una secuencia de aminoácidos contigua que atraviesa una bicapa lipídica y tiene una estructura secundaria α -helicoidal en la bicapa lipídica cuando está presente en un polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresa en una célula de mamífero; y
en donde el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno, un receptor de progesterona o un receptor de andrógenos, en donde cuando el polipéptido quimérico de cadena única se expresa en una célula, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es extracelular y en donde:

65

- (i) cuando va en la dirección N-terminal a C-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única comprende el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelular, el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular; o
- 5 (ii) cuando va en la dirección C-terminal a N-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única comprende el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelular, el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular
- 10 En una forma de realización, el dominio de señalización intracelular del polipéptido quimérico de cadena única de la invención comprende un dominio coestimulador y un motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (ITAM), en donde opcionalmente el dominio coestimulador y el ITAM son intracelulares y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es extracelular, en donde el ITAM del receptor de antígeno quimérico de cadena única comprende preferiblemente una secuencia de señalización citoplasmática de CD3 ζ
- 15 En una forma de realización, el dominio de unión al antígeno extracelular del polipéptido quimérico de cadena única de la invención se selecciona del grupo que consiste en: un scFv, un (scFv)₂, un dominio V_HH y un dominio V_{NAR}, donde el dominio de unión al antígeno extracelular es preferiblemente un scFv.
- 20 En una forma de realización, el dominio de unión a antígeno extracelular del polipéptido quimérico de cadena única de la invención se une específicamente a un solo antígeno o se une específicamente a dos antígenos diferentes, en donde preferiblemente el antígeno único o al menos uno de los dos antígenos diferentes es un antígeno tumoral, tal como un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en: CD19, WT-1, CD22, L1-CAM, ROR-1, CD30, CD125, AFP, CEA, ETA, MAGE y MUC16, en particular en donde el antígeno tumoral es CD19.
- 25 En una forma de realización, el dominio transmembrana del polipéptido quimérico de cadena única de la invención es un dominio transmembrana de: una cadena α de un receptor de células T, una cadena β de un receptor de células T, una cadena ζ de un receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137 o CD154.
- 30 En una forma de realización, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas del polipéptido quimérico de cadena única de la invención es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno.
- En una forma de realización, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular del polipéptido quimérico de cadena única de la invención es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno humano, en donde el
- 35 dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno humano tiene preferiblemente una secuencia de tipo salvaje, excepto que comprende una o ambas de una sustitución en la posición de aminoácido 521 y una sustitución en la posición de aminoácido 537, cada una numerada en relación con la secuencia de tipo salvaje de longitud completa del receptor de hormona humana.
- 40 En una forma de realización, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas y el dominio transmembrana del polipéptido quimérico de cadena única de la invención están separados por 1 a 500 aminoácidos, tal como por 1 a 250 aminoácidos, por 1 a 100 aminoácidos, por 1 a 50 aminoácidos o por 1 a 25 aminoácidos.
- 45 En una forma de realización, el dominio coestimulador del polipéptido quimérico de cadena única de la invención es un dominio coestimulador citoplasmático de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C y B7-H3, en particular de 4-1BB o CD28.
- La presente invención también se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico de cadena única de la presente invención.
- 50 La presente invención también se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico de la presente invención.
- La presente invención también se refiere a una célula de mamífero que comprende el ácido nucleico de la presente invención o el vector de la presente invención.
- 55 En una forma de realización, la célula de mamífero de la presente invención es una célula T, tal como una célula T seleccionada del grupo que consiste en: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural.
- 60 La presente invención también se refiere a un método *in vitro* para inducir la localización en la membrana plasmática de un polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero, comprendiendo el método:
- poner en contacto una célula de mamífero que expresa el polipéptido quimérico de cadena única de la presente invención con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula. En una forma de realización, la célula de
- 65 mamífero es una célula T, tal como una célula T seleccionada del grupo que consiste en: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural.

La presente invención también se refiere al uso del polipéptido quimérico de cadena única de la presente invención en un método de terapia. Preferiblemente, el uso es en un método para tratar el cáncer en un mamífero que tiene cáncer, en donde el polipéptido quimérico de cadena única se va a expresar en una célula de mamífero y el método comprende inducir la localización en la membrana plasmática del polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero que expresa el polipéptido quimérico de cadena única poniendo en contacto la célula de mamífero con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula. En una forma de realización, la célula de mamífero es una célula T, tal como una célula T seleccionada del grupo que consiste en: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural.

La invención está limitada por las reivindicaciones adjuntas.

ENSEÑANZA GENERAL

La presente divulgación proporciona enseñanzas que en algunos aspectos van más allá de la invención como tal, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. Las enseñanzas se proporcionan para situar la invención real en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Dicha información técnica adicional que no cae dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, no es parte de la invención. En particular, los términos "forma de realización" y "aspecto" no deben interpretarse como necesariamente referidos a una forma de realización de la invención, a menos que la "forma de realización" o el "aspecto" en cuestión se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones.

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la localización reversible en la membrana extracelular de polipéptidos quiméricos que incluyen un dominio transmembrana se puede utilizar para aplicaciones médicas en las que se desea expresar de forma reversible en la membrana extracelular una proteína o un péptido de interés. Una característica ejemplar de la presente divulgación es que la toxicidad asociada con las células T CAR se puede regular expresando reversiblemente en su superficie un dominio de unión a antígeno de un CAR.

La presente divulgación se basa además, al menos en parte, en el descubrimiento de que la localización de la membrana plasmática o la localización de la membrana extracelular de polipéptidos quiméricos que incluyen un dominio transmembrana y un dominio de unión del ligando del receptor de hormonas, donde el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a aproximadamente 700 aminoácidos (por ejemplo, 1 a aproximadamente 500 aminoácidos), y el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas no están presentes en el mismo polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero (por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico de cadena única), en una célula de mamífero se puede regular poniendo en contacto la célula de mamífero con una hormona o un análogo de hormona.

En algunas formas de realización, la inducción reversible de la localización de la membrana plasmática o la localización de la membrana extracelular de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos quiméricos de cadena única, receptores de antígenos quiméricos de cadena única y/o receptores de antígenos quiméricos multicadena) utilizando una o más de las composiciones o métodos divulgados en este documento puede ser útil en el área de inmunoterapia adoptiva basada en células, en la que las células inmunes aisladas de un sujeto pueden modificarse para expresar proteínas sintéticas que permiten que las células realicen nuevas funciones terapéuticas después de que posteriormente se transfieran nuevamente al sujeto. Ejemplos no limitativos de dichas proteínas sintéticas son los receptores de antígenos quiméricos (CAR) y los receptores de células T diseñados (TCR).

En algunas formas de realización, la inducción reversible de la localización de la membrana plasmática o la localización de la membrana extracelular de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos quiméricos de cadena única, receptores de antígenos quiméricos de cadena única y/o receptores de antígenos quiméricos multicadena) utilizando una o más de las composiciones o métodos divulgados en este documento puede ser útil para controlar los efectos tóxicos de las células T de antígeno quimérico (células CAR-T) involucradas en la eliminación de células cancerosas al regular la presencia o ausencia de una fracción de unión a antígeno en la membrana plasmática o la membrana extracelular de la célula.

En el presente documento se describen polipéptidos quiméricos de cadena única que incluyen: un dominio transmembrana; y un dominio de unión del ligando del receptor de hormonas, donde: el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a 500 aminoácidos; y el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas no están presentes en el mismo polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de: una cadena de un receptor de células T, cadena β del receptor de células T, cadena ζ del receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137 o CD154. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno, un receptor de progesterona o un receptor de andrógenos. En algunas

formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno.

En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas se encuentran directamente adyacentes entre sí. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas están separados por 1 a 500 aminoácidos (por ejemplo, 1 a 250 aminoácidos, o aproximadamente 1 a 50 aminoácidos).

También se describen en este documento ácidos nucleicos que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento. También se describen en este documento vectores que incluyen cualquiera de los ácidos nucleicos que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento. También se describen en este documento células de mamíferos que incluyen cualquiera de los vectores descritos en este documento.

También se describen en este documento métodos para inducir la localización de la membrana de un polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero que incluyen: poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula.

También se describen en este documento métodos para alterar de forma reversible la localización de la membrana de un polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero que incluyen: (a) poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula; y (b) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad reducida de la hormona o del análogo de hormona que da como resultado un nivel reducido del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula de mamífero. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: (c) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad mayor de la hormona o del análogo de la hormona que da como resultado un nivel mayor del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula en comparación con el nivel del paso (b).

Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: introducir un ácido nucleico que codifica el polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero para generar la célula de mamífero que expresa el polipéptido quimérico de cadena única. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula T (por ejemplo, una célula T seleccionada del grupo de una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural).

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula de mamífero obtenida previamente de un sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, se ha identificado o diagnosticado que el sujeto tiene un cáncer. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: obtener la célula de mamífero del sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el paso de contacto se realiza *in vitro*. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la etapa de contacto se realiza en un mamífero.

También se describen en este documento receptores de antígenos quiméricos de cadena única que incluyen: un dominio de unión a antígeno extracelular; un dominio transmembrana; un dominio de unión al ligando del receptor de hormonas; un dominio coestimulador; y un motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (ITAM); donde: el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a 500 aminoácidos; y el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas no están presentes en el mismo polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se selecciona del grupo de: un scFv, un (scFv)₂, un dominio V_HH y un dominio V_{NAR}. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular es un scFv.

En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a un solo antígeno. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el antígeno único es un antígeno tumoral. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el antígeno tumoral se selecciona del grupo de: CD19, WT-1, CD22, L1-CAM, ROR-1, CD30, CD125, APP, CEA, ETA, MAGE y MUC16. En algunas formas de realización

de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el antígeno tumoral es CD19. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a dos antígenos diferentes.

En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de: una cadena α de un receptor de células T, cadena β del receptor de células T, cadena ζ del receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137 o CD154. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno, un receptor de progesterona o un receptor de andrógenos. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno.

En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio coestimulador es un dominio coestimulador citoplasmático de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C y B7-H3. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio coestimulador es 4-1BB o CD28. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el ITAM incluye una secuencia de señalización citoplasmática de CD3 ζ .

En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas se encuentran directamente adyacentes entre sí. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas están separados por 1 a 500 aminoácidos (por ejemplo, 1 a 250 aminoácidos o 1 a 50 aminoácidos).

También se describen en este documento ácidos nucleicos que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento. También se describen en este documento vectores que incluyen un ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento. También se describen células de mamíferos que incluyen cualquiera de los vectores descritos en este documento.

También se describen métodos para inducir la localización en la membrana de un receptor de antígeno quimérico de cadena única en una célula de mamífero que incluyen: poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quimérico de cadena única descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del receptor de unión a antígeno quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula.

También se describen en este documento métodos para alterar la localización de la membrana de un receptor de antígeno quimérico de cadena única en una célula de mamífero que incluyen: (a) poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quimérico de cadena única descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del receptor de unión a antígeno quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula; y (b) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad de la hormona o del análogo de hormona que da como resultado un nivel reducido del receptor de antígeno quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula. Algunas formas de realización de estos métodos incluyen, además: (c) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad de la hormona o del análogo de la hormona que da como resultado un mayor nivel de receptor de antígeno quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula en comparación con el nivel en (b).

Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: introducir un ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno quimérico de cadena única en una célula de mamífero para generar la célula de mamífero que expresa el receptor de antígeno quimérico de cadena única. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula T. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula T se selecciona del grupo de: una célula T CD5 $^{+}$, una célula T CD4 $^{+}$, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula de mamífero obtenida previamente de un sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, se ha identificado o diagnosticado que el sujeto tiene un cáncer. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: obtener la célula de mamífero del sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el paso de

contacto se realiza *in vitro*. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la etapa de contacto se realiza en un mamífero. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el mamífero tiene un cáncer. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la etapa de contacto da como resultado el tratamiento del cáncer en el mamífero.

También se describen en este documento receptores de antígenos quiméricos multicadena que incluyen al menos un primer polipéptido que incluye: un dominio de unión a antígeno extracelular; un dominio transmembrana; y un dominio de unión al ligando del receptor de hormonas; donde: el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a 500 aminoácidos; y el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas no están ambos presentes en el mismo polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se selecciona del grupo que consiste en: un scFv, un (scFv)₂, un dominio V_HH y un dominio V_{NAR}. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular es un scFv.

En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a un solo antígeno. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el antígeno único es un antígeno tumoral. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el antígeno tumoral se selecciona del grupo de: CD19, WT-1, CD22, L1-CAM, ROR-1, CD30, CD125, APP, CEA, ETA, MAGE y MUC16. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el antígeno tumoral es CD19. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a dos antígenos diferentes.

En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de: una cadena α de un receptor de células T, cadena β del receptor de células T, cadena ζ del receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137 o CD154. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno, un receptor de progesterona o un receptor de andrógenos. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno.

En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas se encuentran directamente adyacentes entre sí. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas están separados por 1 a 500 aminoácidos (por ejemplo, 1 a 250 aminoácidos o 1 a 50 aminoácidos).

En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el al menos un polipéptido incluye además un dominio coestimulador. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio coestimulador es un dominio coestimulador citoplasmático de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C o B7-H3. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio coestimulador es 4-1BB o CD28.

También se describen en este documento métodos para inducir la localización de la membrana de un receptor de antígeno quimérico multicadena en una célula de mamífero que incluyen: poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quimérico multicadena descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del receptor de unión a antígeno quimérico multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula.

También se describen en este documento métodos para alterar la localización de la membrana de un receptor de antígeno quimérico multicadena en una célula de mamífero que incluyen: (a) poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quimérico multicadena descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del receptor de unión a antígeno quimérico multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula; y (b) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad de la hormona o el análogo de hormona con una cantidad de la hormona o el análogo de hormona que da como resultado un nivel disminuido del receptor de unión a antígeno quimérico multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: (c) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad de la hormona o del análogo de la hormona que da como resultado un aumento en el nivel del receptor de unión a antígeno quimérico multicadena en

el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: introducir un ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno quimérico de cadena única en una célula de mamífero para generar la célula de mamífero que expresa el receptor de antígeno quimérico de cadena única. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula T. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula T se selecciona del grupo de: una célula T CD4⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula de mamífero obtenida previamente de un sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, se ha identificado o diagnosticado que el sujeto tiene un cáncer. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: obtener la célula de mamífero del sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el paso de contacto se realiza *in vitro*. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la etapa de contacto se realiza en un mamífero. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el mamífero tiene un cáncer. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la etapa de contacto da como resultado el tratamiento del cáncer en el mamífero.

También se describen en este documento métodos para tratar un cáncer en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que incluyen: (a) administrar al sujeto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento o cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos multicadena descritos en este documento, donde el dominio de unión al antígeno se une específicamente a un antígeno expresado por el cáncer en el sujeto; (b) administrar al sujeto una cantidad de una hormona u hormona suficiente para inducir la localización del receptor de antígeno quimérico de cadena única o multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula; (c) determinar la presencia o gravedad de uno o más síntomas asociados con toxicidad, el nivel de una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas, o ambos, en el sujeto después de (b); (d) comparar la presencia o gravedad determinada de uno o más síntomas asociados con toxicidad, el nivel determinado de una o más citocinas asociadas con la tormenta de citocinas, o ambos, con un control o controles; y (e) administrar al sujeto una cantidad de la hormona o análogo de la hormona suficiente para reducir el nivel del receptor de antígeno quimérico de cadena única o multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula, de modo que la presencia o gravedad de uno o más síntomas asociados con toxicidad, el nivel de una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas, o ambos, se reduzca en el sujeto después de (e).

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (e) se reduce al menos en un 25 % en comparación con la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (b). En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (e) se reduce al menos en un 50 % en comparación con la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (b). En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (e) se reduce en al menos un 75 % en comparación con el nivel de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (b). En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (e) se reduce en un 100 % en comparación con el nivel de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (b).

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, los uno o más síntomas asociados con la toxicidad se seleccionan del grupo que consiste en: fiebre alta, hinchazón, escalofríos, hipotensión, taquicardia, astenia, dolor de cabeza, sarpullido, picazón en la garganta, disnea, enrojecimiento, fatiga extrema, náuseas y edema cerebral. En algunas formas de realización de estos métodos, las una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas se seleccionan del grupo que consiste en: incluyen factor de necrosis tumoral alfa, IFN γ , IL-10, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-10, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-5.

También se describen en este documento polipéptidos quiméricos de cadena única que incluyen: un dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelular; y un dominio transmembrana, donde: el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas y el dominio transmembrana extracelular se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a 700 aminoácidos; y el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelular no están presentes en un único polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de: una cadena α de un receptor de células T, cadena β del receptor de células T, cadena ζ del receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137 o CD154. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno, un receptor de progesterona o un receptor de andrógenos. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos

- quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno humano. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno humano tiene una secuencia de tipo salvaje, excepto que comprende una o ambas de una sustitución en la posición de aminoácido 521 y una sustitución en la posición de aminoácido 537, cada una numerada en relación con la secuencia de tipo salvaje de longitud completa del receptor de hormona humana.
- En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio transmembrana se encuentran directamente adyacentes entre sí. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio transmembrana están separados por 1 a 700 aminoácidos (por ejemplo, 1 a 500 aminoácidos, 1 a 250 aminoácidos, 1 a 100 aminoácidos, 1 a 50 aminoácidos o 1 a 25 aminoácidos).
- En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, cuando va en la dirección N-terminal a C-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única incluye el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelulares y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, cuando va en la dirección del extremo C al extremo N, el polipéptido quimérico de cadena única incluye el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelulares y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, cuando va en la dirección N-terminal a la C-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única incluye el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización de cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento, cuando va en la dirección C-terminal a la N-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única incluye el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana.
- También se describen en este documento ácidos nucleicos que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento. También se describen en este documento vectores que incluyen un ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento. También se describen en este documento células de mamíferos que incluyen cualquiera de los vectores descritos en este documento. En algunas formas de realización de cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento, la célula de mamífero es una célula T. En algunas formas de realización de cualquiera de las células de mamíferos descritas en este documento, la célula T se selecciona del grupo de: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural.
- También se describen en este documento métodos para inducir la localización en la membrana plasmática de un polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero que incluyen: (a) poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula.
- También se describen en este documento métodos para alterar de forma reversible la localización en la membrana plasmática de un polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero que incluyen: (a) poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula; y (b) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad reducida de la hormona o del análogo de hormona que da como resultado un nivel reducido del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula de mamífero. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: (c) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad mayor de la hormona o del análogo de la hormona que da como resultado un nivel mayor del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula en comparación con el nivel del paso (b). Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además, antes del paso (a), introducir un ácido nucleico que codifica el polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero para generar la célula de mamífero que expresa el polipéptido quimérico de cadena única.
- En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula T. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula T se selecciona del grupo de: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula de mamífero obtenida previamente de un sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, se ha identificado o diagnosticado que el sujeto tiene un cáncer.

Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: obtener la célula de mamífero del sujeto.

5 En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el paso o los pasos de contacto se realizan *in vitro*. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el paso o los pasos de contacto se realizan en un mamífero.

10 También se describen en este documento receptores de antígenos quiméricos de cadena única que incluyen: un dominio de unión a antígeno extracelular; un dominio de unión de ligando de receptor de hormona extracelular; un dominio transmembrana; un dominio coestimulador intracelular; y un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor intracelular (ITAM); donde: el dominio transmembrana y el dominio de unión de ligando de receptor de hormona extracelular se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a 700 aminoácidos; y el dominio transmembrana y el dominio de unión de ligando de receptor de hormona extracelular no están ambos presentes en un único polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se selecciona del grupo que consiste en: un scPv, un (scPv)₂, un dominio V_HH y un dominio V_{NAR}. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular es un scPv.

20 En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a un solo antígeno. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única, el antígeno único es un antígeno tumoral. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el antígeno tumoral se selecciona del grupo de: CD19, WT-1, CD22, L1-CAM, ROR-1, CD30, CD125, APP, CEA, ETA, MAGE y MUC16. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el antígeno tumoral es CD19. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a dos antígenos diferentes. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, al menos uno de los dos antígenos diferentes es un antígeno tumoral. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el antígeno tumoral se selecciona del grupo de: CD19, WT-1, CD22, L1-CAM, ROR-1, CD30, CD125, APP, CEA, ETA, MAGE y MUC16. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el antígeno tumoral es CD19.

35 En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de: una cadena α de un receptor de células T, cadena β del receptor de células T, cadena ζ del receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137 o CD154. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno, un receptor de progesterona o un receptor de andrógenos. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno humano. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno humano tiene una secuencia de tipo salvaje, excepto que comprende una o ambas de una sustitución en la posición de aminoácido 521 y una sustitución en la posición de aminoácido 537, cada una numerada en relación con la secuencia de tipo salvaje de longitud completa del receptor de hormona humana.

50 En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio coestimulador intracelular es un dominio coestimulador citoplasmático de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C o B7-H3. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio coestimulador intracelular es el dominio coestimulador citoplasmático de 4-1BB o CD28. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el ITAM intracelular comprende una secuencia de señalización citoplasmática de CD3 ζ .

60 En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio transmembrana se encuentran directamente adyacentes entre sí. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de

hormona extracelular y el dominio transmembrana están separados por 1 a 700 aminoácidos (por ejemplo, 1 a 500 aminoácidos, 1 a 250 aminoácidos, 1 a 100 aminoácidos, 1 a 50 aminoácidos o 1 a 25 aminoácidos).

En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, cuando va en la dirección N-terminal a C-terminal, el receptor de antígeno quimérico de cadena única incluye el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio transmembrana, el dominio coestimulador intracelular y el ITAM. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, cuando va en la dirección C-terminal a la N-terminal, el receptor de antígeno quimérico de cadena única incluye el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio transmembrana, el dominio coestimulador intracelular y el ITAM. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, cuando va en la dirección N-terminal a la C-terminal, el receptor de antígeno quimérico de cadena única comprende el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión del antígeno extracelular, el dominio transmembrana, el dominio coestimulador intracelular y el ITAM. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento, cuando va en la dirección C-terminal a N-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única incluye el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio transmembrana, el dominio coestimulador intracelular y el ITAM.

También se describen en este documento ácidos nucleicos que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento. También se describen en este documento vectores que incluyen un ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento. También se describen células de mamíferos que incluyen cualquiera de los vectores descritos en este documento. En algunas formas de realización de cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento, la célula de mamífero es una célula T. En algunas formas de realización de cualquiera de las células de mamíferos descritas en este documento, la célula T se selecciona del grupo de: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural.

También se describen métodos para inducir la localización en la membrana plasmática de un receptor de antígeno quimérico de cadena única en una célula de mamífero que incluyen: (a) poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quimérico de cadena única descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del receptor de unión a antígeno quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula.

También se describen en este documento métodos para alterar la localización en la membrana plasmática de un receptor de antígeno quimérico de cadena única en una célula de mamífero que incluyen: (a) poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quimérico de cadena única descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del receptor de unión a antígeno quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula; y (b) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad de la hormona o del análogo de hormona que da como resultado un nivel reducido del receptor de antígeno quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: (c) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad de la hormona o del análogo de la hormona que da como resultado un aumento del nivel del receptor de antígeno quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula en comparación con el nivel en (b). Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además antes del paso (a): introducir un ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno quimérico de cadena única en una célula de mamífero para generar la célula de mamífero que expresa el receptor de antígeno quimérico de cadena única.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula T. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula T se selecciona del grupo de: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula de mamífero obtenida previamente de un sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, se ha identificado o diagnosticado que el sujeto tiene un cáncer. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: obtener la célula de mamífero del sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el paso o los pasos de contacto se realizan *in vitro*. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el paso o los pasos de contacto se realizan en un mamífero. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el mamífero tiene un cáncer. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la etapa de contacto da como resultado el tratamiento del cáncer en el mamífero.

También se describen en este documento receptores de antígenos quiméricos multicadena que incluyen al menos un primer polipéptido que incluye: un dominio de unión a antígeno extracelular; un dominio de unión a ligando de receptor de

- hormona extracelular; y un dominio transmembrana; donde: el dominio transmembrana y el dominio de unión a ligando de receptor de hormona extracelular se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a 700 aminoácidos; y el dominio transmembrana y el dominio de unión a ligando de receptor de hormona extracelular no están ambos presentes en un único polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se selecciona del grupo que consiste en: un scPv, un (scPv)₂, un dominio V_HH y un dominio V_{NAR}. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular es un scPv.
- En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a un solo antígeno. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el antígeno único es un antígeno tumoral. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el antígeno tumoral se selecciona del grupo de: CD19, WT-1, CD22, L1-CAM, ROR-1, CD30, CD125, APP, CEA, ETA, MAGE y MUC16. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el antígeno tumoral es CD19. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a dos antígenos diferentes. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, al menos uno de los dos antígenos diferentes es un antígeno tumoral. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el antígeno tumoral se selecciona del grupo de: CD19, WT-1, CD22, L1-CAM, ROR-1, CD30, CD125, APP, CEA, ETA, MAGE y MUC16. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el antígeno tumoral es CD19.
- En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de: una cadena α de un receptor de células T, cadena β del receptor de células T, cadena ζ del receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137 o CD154. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno, un receptor de progesterona o un receptor de andrógenos. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno humano. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno humano tiene una secuencia de tipo salvaje, excepto que incluye una o ambas de una sustitución en la posición de aminoácido 521 y una sustitución en la posición de aminoácido 537, cada una numerada en relación con la secuencia de tipo salvaje de longitud completa del receptor de hormona humana.
- En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio transmembrana se encuentran directamente adyacentes entre sí. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio transmembrana están separados por 1 a 700 aminoácidos (por ejemplo, 1 a 500 aminoácidos, 1 a 250 aminoácidos, 1 a 100 aminoácidos, 1 a 50 aminoácidos o 1 a 25 aminoácidos).
- En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el al menos un polipéptido incluye además un dominio coestimulador intracelular. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio coestimulador intracelular es un dominio coestimulador citoplasmático de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C o B7-H3. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, el dominio coestimulador intracelular es el dominio coestimulador citoplasmático de 4-1BB o CD28.
- En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, cuando va en la dirección N-terminal a C-terminal, el al menos un primer polipéptido incluye el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelulares y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, cuando va en la dirección C-terminal a N-terminal, el al menos un primer polipéptido incluye el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelulares y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento, cuando va en la dirección N-terminal a C-terminal, el al menos un primer polipéptido incluye el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos

quiméricos multcadena descritos en este documento, cuando va en la dirección C-terminal a N-terminal, el al menos un primer polipéptido incluye el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana.

También se divulgan en este documento ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multcadena descritos en este documento. También se describen en este documento conjuntos de ácidos nucleicos que juntos codifican cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multcadena descritos en este documento. También se describen en este documento células de mamíferos que incluyen un ácido nucleico que codifica cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multcadena descritos en este documento. También se describen en este documento células de mamíferos que incluyen un conjunto de ácidos nucleicos que juntos codifican cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos multcadena descritos en este documento. En algunas formas de realización de cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento, la célula de mamífero es una célula T. En algunas formas de realización de cualquiera de las células de mamíferos descritas en este documento, la célula T se selecciona del grupo que consiste en: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural.

También se describen en este documento métodos para inducir la localización en la membrana plasmática de un receptor de antígeno quimérico multcadena en una célula de mamífero que incluyen: (a) poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quimérico multcadena descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del receptor de unión a antígeno quimérico multcadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula.

También se describen en este documento métodos para alterar la localización de la membrana plasmática de un receptor de antígeno quimérico multcadena en una célula de mamífero que incluyen: (a) poner en contacto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quimérico multcadena descritos en este documento con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del receptor de unión a antígeno quimérico multcadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula; y (b) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad de la hormona o el análogo de hormona con una cantidad de la hormona o el análogo de hormona que da como resultado un nivel disminuido del receptor de unión a antígeno quimérico multcadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además: (c) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad de la hormona o del análogo de la hormona que da como resultado un aumento en el nivel del receptor de unión a antígeno quimérico multcadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además antes del paso (a): introducir un ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno quimérico multcadena o un conjunto de ácidos nucleicos que juntos codifican el receptor quimérico multcadena, en una célula de mamífero para generar la célula de mamífero que expresa el receptor de antígeno quimérico multcadena. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula T. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula T se selecciona del grupo de: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula Treg y una célula T asesina natural. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula de mamífero obtenida previamente de un sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, se ha identificado o diagnosticado que el sujeto tiene un cáncer. Algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen, además la obtención de la célula de mamífero del sujeto. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el paso de contacto se realiza *in vitro*. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la etapa de contacto se realiza en un mamífero. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el mamífero tiene un cáncer. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la etapa de contacto da como resultado el tratamiento del cáncer en el mamífero.

También se describen en este documento métodos para tratar un cáncer en un sujeto que incluyen: (a) administrar al sujeto una célula de mamífero que expresa cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento o cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos multcadena descritos en este documento, donde el dominio de unión al antígeno se une específicamente a un antígeno expresado por el cáncer en el sujeto; (b) administrar al sujeto una cantidad de una hormona u hormona suficiente para inducir la localización del receptor de antígeno quimérico de cadena única o multcadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula; (c) determinar la presencia o gravedad de uno o más síntomas asociados con toxicidad o el nivel de una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas, o ambos, en el sujeto después de (b); (d) comparar la presencia o gravedad determinada de uno o más síntomas asociados con toxicidad o el nivel determinado de una o más citocinas asociadas con la tormenta de citocinas, o ambos, con un control o controles; y (e) administrar al sujeto una cantidad de la hormona o análogo de hormona suficiente para reducir el nivel del receptor de antígeno quimérico de cadena única o multcadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula, de modo que la presencia o gravedad de uno o más síntomas asociados con toxicidad o el nivel de una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas, o ambos, se reduzca en el sujeto después de (e).

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (e) se reduce al menos en un 25 % en comparación con la

cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (b). En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (e) se reduce al menos en un 50 % en comparación con la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (b). En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (e) se reduce en al menos un 75 % en comparación con el nivel de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (b). En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (e) se reduce en un 100 % en comparación con el nivel de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (b).

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, los uno o más síntomas asociados con la toxicidad se seleccionan del grupo de: fiebre alta, hinchazón, escalofríos, hipotensión, taquicardia, astenia, dolor de cabeza, sarpullido, picazón en la garganta, disnea, enrojecimiento, fatiga extrema, náuseas y edema cerebral. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas se seleccionan del grupo de: incluyen factor de necrosis tumoral alfa, IFN γ , IL-10, IL-1, IL-2, IL-6, IL- β e IL-10, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-5.

El uso del término "un" antes de un sustantivo significa "uno o más" del sustantivo en particular. Por ejemplo, la frase "una célula de mamífero" significa "una o más células de mamífero".

El término "polipéptido quimérico de cadena única" significa un polipéptido de cadena única que incluye una primera secuencia de aminoácidos contigua (por ejemplo, un primer dominio) y una segunda secuencia de aminoácidos contigua (por ejemplo, un segundo dominio), donde la primera secuencia de aminoácidos contigua y la segunda secuencia de aminoácidos contigua no están presentes en el mismo polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero. En algunos ejemplos, la primera secuencia de aminoácidos contigua y la segunda secuencia de aminoácidos contigua se unen directamente entre sí en el polipéptido quimérico de cadena única. En algunos ejemplos, la primera secuencia de aminoácidos contigua y la segunda secuencia de aminoácidos contigua están separadas por uno o más aminoácidos intermedios (por ejemplo, uno o más dominios). El término "polipéptido quimérico de cadena única" no pretende limitar de ninguna manera la posición relativa de la primera secuencia de aminoácidos contigua y la segunda secuencia contigua en el polipéptido de cadena única. En el presente documento se describen ejemplos no limitativos de polipéptidos quiméricos de cadena única (por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos de cadena única). Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de polipéptidos quiméricos de cadena única (por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos de cadena única).

Los términos "receptor de antígeno quimérico" y "CAR" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a moléculas multimódulo artificiales capaces de desencadenar o inhibir la activación de una célula inmunitaria que, en general, pero no exclusivamente, comprenden un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio de unión de ligando/antígeno), un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular. Las moléculas CAR y sus derivados (por ejemplo, variantes CAR) se describen, por ejemplo, en la Solicitud PCT N.º US2014/016527; Fedorov y col. *Sci Transl Med* (2013);5(215):215ra172; Glienke et al. *Front Pharmacol* (2015) 6:21; Kakarla y Gottschalk *Cancer J* (2014) 20(2):151-5; Riddell et al. *Cancer J* (2014) 20(2):141-4; Pegram y otros *Cancer J* (2014) 20(2):127-33; Cheadle y col. *Immunol Rev* (2014) 257(1):91-106; Barrett y col. *Annu Rev Med* (2014) 65:333-47; Sadelain et al. *Cancer Discov* (2013) 3(4):388-98; Cartellieri et al., *J Biomed Biotechnol* (2010) 956304.

El término "polipéptido quimérico multicadena" significa un polipéptido que incluye dos o más polipéptidos de cadena única, donde al menos uno de los dos o más polipéptidos de cadena única es un polipéptido quimérico de cadena única como se define y describe en este documento. En el presente documento se describen ejemplos no limitativos de polipéptidos quiméricos multicadena (por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos multicadena). Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de polipéptidos quiméricos multicadena (por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos multicadena).

El término "dominio transmembrana" significa un dominio de un polipéptido que incluye al menos una secuencia de aminoácidos contigua que atraviesa una bicapa lipídica cuando está presente en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresa en una célula de mamífero. Por ejemplo, un dominio transmembrana puede incluir una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez secuencias de aminoácidos contiguas que atraviesan cada una una bicapa lipídica cuando están presentes en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresan en una célula de mamífero. Como se sabe en la técnica, un dominio transmembrana puede, por ejemplo, incluir al menos una (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) secuencia de aminoácidos contigua (que atraviesa una bicapa lipídica cuando está presente en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresa en una célula de mamífero) que tiene una estructura secundaria α -helicoidal en la bicapa lipídica. En algunas formas de realización, un dominio transmembrana puede incluir dos o más secuencias de aminoácidos contiguas (que atraviesan cada una una bicapa lipídica cuando están presentes en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresan en una célula de mamífero) que forman una estructura secundaria de barril β en la bicapa lipídica. En el presente documento se describen ejemplos no limitativos de dominios transmembrana. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de dominios transmembrana.

La frase "lado extracelular de la membrana plasmática" cuando se utiliza para describir la ubicación de un polipéptido significa que el polipéptido incluye al menos un dominio transmembrana que atraviesa la membrana plasmática y al menos un dominio (por ejemplo, al menos un dominio de unión a antígeno) que se encuentra en el espacio extracelular.

5 El término "dominio de unión del ligando del receptor hormonal" significa un dominio en un polipéptido del receptor hormonal que se une específicamente a una hormona o un análogo hormonal. En el presente documento se describen ejemplos no limitativos de dominios de unión de ligando de receptor de hormona (LBD). En algunos casos, un LBD de un receptor de hormona nuclear se selecciona de un receptor de estrógeno, un receptor de ecdisona, un receptor PPAR γ , un receptor de glucocorticoides, un receptor de andrógenos, un receptor de hormona tiroidea, un receptor de mineralocorticoides, un receptor de progesterona, un receptor de vitamina D, un receptor PPAR, un receptor PPAR β/δ , un receptor de pregnano X, un receptor de hígado X, un receptor farnesoide X, un receptor retinoide X, un receptor huérfano relacionado con RAR y un receptor de ácido retinoico. En algunos casos, una cadena polipeptídica de un polipéptido heterodimérico de la presente divulgación comprende un único LBD de un receptor de hormona nuclear. En algunos casos, una cadena polipeptídica de un polipéptido heterodimérico de la presente divulgación comprende múltiples (por ejemplo, dos o más) LBD de un receptor de hormona nuclear. En algunos casos, una cadena polipeptídica de un polipéptido heterodimérico de la presente divulgación comprende dos LBD de un receptor de hormona nuclear. En algunos casos, una cadena polipeptídica de un polipéptido heterodimérico de la presente divulgación comprende tres LBD de un receptor de hormona nuclear. Cuando una cadena polipeptídica de un polipéptido heterodimérico de la presente divulgación comprende múltiples (por ejemplo, dos o más) LBD de un receptor de hormona nuclear, en algunos casos los múltiples LBD comprenden secuencias de aminoácidos idénticas. En algunos casos, los dos o más LBD están en tándem, ya sea directamente o separados por un enlazador (por ejemplo, cualquiera de los enlazadores descritos en este documento).

25 El término "dominio de unión al antígeno" significa un dominio que se une específicamente a un antígeno objetivo. En algunos ejemplos, un dominio de unión a antígeno se puede formar a partir de los aminoácidos presentes dentro de un polipéptido de cadena única. En otros ejemplos, un dominio de unión a antígeno se puede formar a partir de aminoácidos presentes dentro de un primer polipéptido de cadena única y los aminoácidos presentes en uno o más polipéptidos de cadena única adicionales (por ejemplo, un segundo polipéptido de cadena única). En este documento se describen ejemplos no limitantes de dominios de unión a antígeno, incluidos, entre otros, scFv o LBD de factores de crecimiento. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de dominios de unión a antígeno.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" se refiere en general a un socio de unión específicamente reconocido por un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento. Los antígenos ejemplares incluyen diferentes clases de moléculas, tales como, entre otros, polipéptidos y fragmentos peptídicos de los mismos, moléculas pequeñas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. En el presente documento se describen ejemplos no limitativos de antígeno o antígenos que pueden unirse específicamente mediante cualquiera de los dominios de unión al antígeno. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de antígeno o antígenos que pueden unirse específicamente mediante cualquiera de los dominios de unión al antígeno.

40 El término "dominio coestimulador" significa un dominio de señalización de un polipéptido transmembrana coestimulador endógeno expresado en un linfocito T que promueve la señalización del receptor de células T corriente abajo y/o la activación de células T. En el presente documento se describen ejemplos no limitativos de dominios coestimuladores. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de dominios coestimuladores. Véase, por ejemplo, Chen et al., Nature Reviews Immunol. 13:227-242, 2013

45 El término "motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor" o "ITAM" significa un motivo de aminoácidos que incluye una secuencia de consenso de cuatro aminoácidos de una tirosina separada de una leucina o una isoleucina por otros dos aminoácidos (YxxL/I). El residuo de tirosina en la secuencia de consenso de cuatro aminoácidos se fosforila después de la interacción de una quinasa de la vía de señalización (por ejemplo, una quinasa de la vía de señalización de los linfocitos). En el presente documento se describen ejemplos no limitativos de ITAM. Se conocen ejemplos adicionales de ITAM en la técnica.

50 El término "hormona" significa una molécula natural que se une específicamente a un dominio de unión de ligando de un receptor hormonal y regula la actividad y/o ubicación del receptor hormonal. En el presente documento se describen ejemplos no limitativos de hormonas. Se conocen ejemplos adicionales de hormonas en la técnica.

55 El término "análogo de hormona" significa una molécula que imita la estructura de una hormona y se une específicamente a un dominio de unión de ligando de un receptor de hormona. En el presente documento se describen ejemplos no limitativos de análogos de hormonas. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de análogos de hormonas.

60 La frase "tratamiento del cáncer" significa una reducción en el número, frecuencia o gravedad de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) síntomas de un cáncer en un sujeto que tiene un cáncer. Se describen en este documento síntomas no limitantes del cáncer. Se conocen en la técnica síntomas adicionales del cáncer.

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

invención. Se describen en este documento métodos y materiales para su uso en la presente invención; también se pueden utilizar otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

- 5 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y figuras, y de los ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 Fig. 1 es un diagrama de diferentes construcciones probadas. Las etiquetas extracelular e intracelular se refieren a la membrana celular, que se representa como un cuadro gris entre estas etiquetas. Se indican el dominio scFv extracelular y los dominios coestimuladores intracelulares ("Costim"), CD3zeta y mCherry.
- 15 Fig. 2 es un conjunto de gráficos de puntos de citometría de flujo para células que expresan una de las diferentes construcciones. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de 4-hidroxitamoxifeno ("4-OHT"). (A) Células T Jurkat transducidas con vectores lentivirales que codifican el CAR canónico o con anti-CD19 (FMC63) ERa-LBD que contiene las construcciones CAR v2, v3 y v4 (B) Las células T humanas CD4 y CD5 primarias se transdujeron con vectores lentivirales que codifican el constructo v4 CAR.
- 20 Fig. 3 es un conjunto de gráficos de puntos de citometría de flujo para células HEK-293T transducidas con vectores lentivirales que codifican fusiones FMC63 CAR que contienen ERa-LBD. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de 4-OHT.
- 25 Fig. 4 es un conjunto de gráficos de puntos de citometría de flujo para células T CD4 humanas primarias transducidas con vectores lentivirales que codifican fusiones FMC63 NHR LBD-CAR y un NHR LBD-CAR que tiene el scFv J6M0. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de 4-OHT.
- 30 Fig. 5A es un diagrama del dominio de unión del ligando del receptor de hormona nuclear V5 NHR-LBD CAR que carece de los dominios coestimuladores y CD3zeta, y un conjunto de 32 diagramas de puntos de citometría de flujo para células transducidas con un vector lentiviral que codifica el constructo V5. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de 4-OHT.
- 35 Fig. 5B es un conjunto de diagramas de citometría de flujo de células T Jurkat no transducidas o células T Jurkat transducidas con un vector lentiviral que codifica un CAR en el que el dominio scFv fue reemplazado por una etiqueta FLAG. Las células transducidas se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de 4-OHT.
- Fig. 6 es un conjunto de diagramas de citometría de flujo de células T Jurkat transducidas con construcciones CAR que tienen LBD de receptor de progesterona. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de mifepristona.
- 40 Fig. 7A es un gráfico que muestra la activación de células T de células T humanas primarias transducidas con vectores lentivirales que codifican el constructo CAR J6M0-ERa-LBD después del cocultivo durante la noche con objetivos negativos al antígeno (línea celular K562) y positivos al antígeno (línea celular MM1S).
- 45 Fig. 7B es un gráfico que muestra la producción de IFN- γ por células T humanas primarias transducidas con vectores lentivirales que codifican el constructo CAR J6M0-ERa-LBD después del cocultivo durante la noche con objetivos negativos al antígeno (línea celular K562) y positivos al antígeno (línea celular MM1S).
- 50 Fig. 8A es un conjunto de diagramas de citometría de flujo que muestran la proliferación de células T CD4 humanas primarias que fueron transducidas con vectores lentivirales que codifican V4 FMC63-ERa-LBD CAR o controles CAR canónicos, cocultivados con objetivos negativos al antígeno (línea celular K562) o positivos al antígeno (línea celular Raji), y con concentraciones crecientes de ligando 4-OHT.
- 55 Fig. 8B es un gráfico que muestra la lisis de objetivos positivos para antígenos (línea celular MM1S) mediada por células T humanas primarias transducidas con vectores lentivirales que codifican construcciones CAR J6M0-ERa-LBD con concentraciones crecientes de 4-OHT.
- Fig. 9 es un gráfico que muestra la expresión superficial de varias construcciones CAR que tienen un LBD en diferentes ubicaciones en relación con la membrana celular a concentraciones crecientes de 4-OHT.
- 60 Fig. 10A es un esquema que muestra la cronología del procedimiento experimental.
- Fig. 10B es un gráfico de barras que muestra la expresión superficial de varias construcciones CAR antes y después del cocultivo con 4-OHT.
- 65 Fig. 11A es un conjunto de diagramas de citometría de flujo que muestran células T Jurkat que fueron transducidas con el CAR FLAG-ERa-LBD y se dejaron sin tratar o se trataron con 4-OHT durante 15 o 120 minutos.

Fig. 11B es un conjunto de diagramas de citometría de flujo que muestran células T humanas que fueron transducidas con un vector lentiviral que codifica el CAR FMC63-ERa-LBD y que se dejaron sin tratar o se trataron con 4-OHT durante 2 horas, 4 horas o 24 horas.

Fig. 12 es un conjunto de diagramas de citometría de flujo de células T humanas primarias que expresan FMC63-CAR que tienen LBD ERa. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de 4-OHT. Algunas muestras fueron pretratadas con 1 μ M de Brefeldina A

Fig. 13 es un diagrama del constructo v2 CAR y del constructo ECD.v1 CAR (también llamado LBD-ECD CAR) probados. La membrana celular se representa como un cuadro gris. Se representan el dominio scFv extracelular, el LBD ERa extracelular, el dominio transmembrana (incrustado en la membrana celular), el dominio intracelular 4-1BB y el dominio intracelular CD3 γ .

Fig. 14 representa un conjunto de gráficos de puntos de citometría de flujo para células que expresan el constructo CAR v2 o el constructo LBD-ECD CAR. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de 4-hidroxitamoxifeno ("4-OHT").

Fig. 15 es un gráfico que muestra la destrucción de células tumorales Nalm 6 (% de lisis) por células T transducidas con un vector lentiviral que codifica el constructo LBD-ECD CAR (ECD.v1). Las células fueron tratadas con entre 1,5 ng/ml y 500 ng/ml de 4-OHT. El control positivo fueron células T transducidas con un vector lentiviral que codifica CAR constitutivo. El control negativo fueron células T con LBD-ECD CAR que no fueron tratadas con 4-OHT.

Fig. 16 representa un conjunto de gráficos de puntos de citometría de flujo para células que expresan un CAR constitutivo, un LBD-ECD CAR o un CAR v2. Las células se dejaron sin tratar o se estimularon con perlas que contenían CD3/CD28 durante 48 horas antes de la citometría de flujo. Las perlas Dynabeads aCD3/aCD28 eran de ThermoFisher Véase Trickett et al., J Immunol Métodos 275:251-255, 2003. Cada construcción se fusionó a una etiqueta cMyc

Fig. 17 es un gráfico que muestra la producción de IL-2 a partir de células CAR-T ECD.v1 o células CAR-T convencionales después del cocultivo durante la noche de células T portadoras de CAR con objetivos NALM-6 en presencia (500 ng/mL) o ausencia de 4-hidroxitamoxifeno.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se describen en este documento polipéptidos quiméricos de cadena única, receptores de antígenos quiméricos de cadena única (CAR) y receptores de antígenos quiméricos multicadena; ácidos nucleicos que los codifican; vectores que incluyen cualquiera de estos ácidos nucleicos; células de mamíferos que incluyen cualquiera de estos vectores; y métodos para inducir reversiblemente la localización de la membrana extracelular y métodos para alterar la localización de la membrana de estos polipéptidos quiméricos de cadena única, receptores de antígenos quiméricos de cadena única y polipéptidos quiméricos multicadena.

También se describen en este documento células de mamíferos modificadas genéticamente que tienen un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, una célula de mamífero modificada genéticamente se deriva de una célula madre, una célula progenitora o una célula derivada de una célula madre o una célula progenitora. En algunos casos, la célula mamífera es un linfocito T o una célula NK.

Aspectos no limitantes de estos polipéptidos quiméricos de cadena única, receptores de antígenos quiméricos de cadena única y receptores de antígenos quiméricos multicadena, ácidos nucleicos, vectores, células de mamíferos y métodos, y se pueden usar en cualquier combinación sin limitación. Aspectos adicionales de estos polipéptidos quiméricos de cadena única, receptores de antígenos quiméricos de cadena única y receptores de antígenos quiméricos multicadena, ácidos nucleicos, vectores, células de mamíferos y métodos.

En algunas formas de realización, las composiciones y/o métodos divulgados en este documento se pueden usar para matar selectivamente células cancerosas en un sujeto en presencia de una hormona o análogo de hormona que se une a un LBD presente en el polipéptido (por ejemplo, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única y/o un receptor de antígeno quimérico multicadena). En algunas formas de realización, en presencia de la hormona o análogo de hormona, el polipéptido (por ejemplo, el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única y/o el receptor de antígeno quimérico multicadena) se localiza en la superficie extracelular, presentando un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un scFv u otro dominio de unión a antígeno descrito en este documento o conocido en la técnica) en el exterior de la célula. El polipéptido (por ejemplo, polipéptido quimérico de cadena única, receptor de antígeno quimérico de cadena única o receptor de antígeno quimérico multicadena) puede reconocer el antígeno al que se une y, por lo tanto, puede matar selectivamente una célula objetivo que exprese el antígeno en su superficie (por ejemplo, una célula cancerosa).

En algunas formas de realización, la localización del polipéptido (por ejemplo, el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena) en la superficie extracelular puede causar toxicidad en el sujeto. En algunas formas de realización, un sujeto que experimenta toxicidad debido a la localización inducida por hormonas o análogos de hormonas del polipéptido (por ejemplo, el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena) en la superficie extracelular se puede tratar o mejorar reduciendo la dosis de la hormona o análogo de hormona, o eliminando por completo el tratamiento con hormona o análogo de hormona del sujeto. Tal reducción de la dosis o eliminación del tratamiento hormonal o análogo hormonal puede hacer que el polipéptido (por ejemplo, el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el polipéptido quimérico multicadena) se elimine de la superficie celular y reduzca o elimine la presentación del dominio de unión al antígeno en la superficie celular, reduciendo o eliminando así la toxicidad en el sujeto.

Polipéptido quimérico de cadena única

15 Polipéptido quimérico de cadena única - LBD de receptor de hormona intracelular

Se divulgan en este documento polipéptidos quiméricos de cadena única que incluyen un dominio transmembrana (por ejemplo, cualquiera de los dominios transmembrana descritos en este documento o conocidos en la técnica) y un dominio de unión del ligando del receptor de hormona (por ejemplo, cualquiera de los dominios de unión del ligando del receptor de hormona descritos en este documento o conocidos en la técnica), donde el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormona se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (por ejemplo, o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento), y el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormona no están ambos presentes en el mismo (un solo) polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero (por ejemplo, un ser humano).

En algunos ejemplos de polipéptidos quiméricos de cadena única, el dominio transmembrana linda directamente con el dominio de unión del ligando del receptor de la hormona (es decir, no hay aminoácidos intermedios entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de la hormona). En algunos ejemplos de los polipéptidos quiméricos de cadena única, el dominio transmembrana y el dominio de unión de ligando de receptor de hormonas están separados por:

30	aproximadamente 760 aminoácidos, aproximadamente 700 aminoácidos, aproximadamente 640 aminoácidos, aproximadamente 580 aminoácidos, aproximadamente 520 aminoácidos, aproximadamente 480 aminoácidos, aproximadamente 450 aminoácidos, aproximadamente 420 aminoácidos, aproximadamente 390 aminoácidos, aproximadamente 360 aminoácidos, aproximadamente 330 aminoácidos, aproximadamente 300 aminoácidos, aproximadamente 270 aminoácidos, aproximadamente 240 aminoácidos, aproximadamente 210 aminoácidos, aproximadamente 190 aminoácidos, aproximadamente 175 aminoácidos, aproximadamente 160 aminoácidos, aproximadamente 145 aminoácidos, aproximadamente 130 aminoácidos, aproximadamente 115 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 85 aminoácidos, aproximadamente 70 aminoácidos, aproximadamente 55 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos, aproximadamente 25 aminoácidos, aproximadamente 16 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 5 aminoácidos, aproximadamente 2 aminoácidos a	aproximadamente 800 aminoácidos, aproximadamente 740 aminoácidos, aproximadamente 680 aminoácidos, aproximadamente 620 aminoácidos, aproximadamente 560 aminoácidos, aproximadamente 500 aminoácidos, aproximadamente 470 aminoácidos, aproximadamente 440 aminoácidos, aproximadamente 410 aminoácidos, aproximadamente 380 aminoácidos, aproximadamente 350 aminoácidos, aproximadamente 320 aminoácidos, aproximadamente 290 aminoácidos, aproximadamente 260 aminoácidos, aproximadamente 230 aminoácidos, aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 185 aminoácidos, aproximadamente 170 aminoácidos, aproximadamente 155 aminoácidos, aproximadamente 140 aminoácidos, aproximadamente 125 aminoácidos, aproximadamente 110 aminoácidos, aproximadamente 95 aminoácidos, aproximadamente 80 aminoácidos, aproximadamente 65 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 14 aminoácidos, aproximadamente 8 aminoácidos, aproximadamente 4 aminoácidos, o aproximadamente 3 aminoácidos (inclusive);	aproximadamente 780 aminoácidos, aproximadamente 720 aminoácidos, aproximadamente 660 aminoácidos, aproximadamente 600 aminoácidos, aproximadamente 540 aminoácidos, aproximadamente 490 aminoácidos, aproximadamente 460 aminoácidos, aproximadamente 430 aminoácidos, aproximadamente 400 aminoácidos, aproximadamente 370 aminoácidos, aproximadamente 340 aminoácidos, aproximadamente 310 aminoácidos, aproximadamente 280 aminoácidos, aproximadamente 250 aminoácidos, aproximadamente 220 aminoácidos, aproximadamente 195 aminoácidos, aproximadamente 180 aminoácidos, aproximadamente 165 aminoácidos, aproximadamente 150 aminoácidos, aproximadamente 135 aminoácidos, aproximadamente 120 aminoácidos, aproximadamente 105 aminoácidos, aproximadamente 90 aminoácidos, aproximadamente 75 aminoácidos, aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 45 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 18 aminoácidos, aproximadamente 12 aminoácidos, aproximadamente 6 aminoácidos,
60	aproximadamente 760 aminoácidos, aproximadamente 700 aminoácidos, aproximadamente 640 aminoácidos, aproximadamente 580 aminoácidos, aproximadamente 520 aminoácidos,	aproximadamente 800 aminoácidos, aproximadamente 740 aminoácidos, aproximadamente 680 aminoácidos, aproximadamente 620 aminoácidos, aproximadamente 560 aminoácidos, aproximadamente 500 aminoácidos,	aproximadamente 780 aminoácidos, aproximadamente 720 aminoácidos, aproximadamente 660 aminoácidos, aproximadamente 600 aminoácidos, aproximadamente 540 aminoácidos, aproximadamente 490 aminoácidos,

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

- aminoácidos, o aproximadamente 600 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 600 aminoácidos a aproximadamente 800 aminoácidos, aproximadamente 780 aminoácidos, aproximadamente 760 aminoácidos, aproximadamente 740 aminoácidos, aproximadamente 720 aminoácidos, aproximadamente 700 aminoácidos, aproximadamente 680 aminoácidos, aproximadamente 660 aminoácidos, aproximadamente 640 aminoácidos, o aproximadamente 620 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 620 aminoácidos a aproximadamente 800 aminoácidos, aproximadamente 780 aminoácidos, aproximadamente 760 aminoácidos, aproximadamente 740 aminoácidos, aproximadamente 720 aminoácidos, aproximadamente 700 aminoácidos, aproximadamente 680 aminoácidos, aproximadamente 660 aminoácidos, o aproximadamente 640 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 640 aminoácidos a aproximadamente 800 aminoácidos, aproximadamente 780 aminoácidos, aproximadamente 760 aminoácidos, aproximadamente 740 aminoácidos, aproximadamente 720 aminoácidos, aproximadamente 700 aminoácidos, aproximadamente 680 aminoácidos, o aproximadamente 660 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 660 aminoácidos a aproximadamente 800 aminoácidos, aproximadamente 780 aminoácidos, aproximadamente 760 aminoácidos, aproximadamente 740 aminoácidos, aproximadamente 720 aminoácidos, aproximadamente 700 aminoácidos, o aproximadamente 680 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 680 aminoácidos a aproximadamente 800 aminoácidos, aproximadamente 780 aminoácidos, aproximadamente 760 aminoácidos, aproximadamente 740 aminoácidos, o aproximadamente 720 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 720 aminoácidos a aproximadamente 800 aminoácidos, aproximadamente 780 aminoácidos, aproximadamente 760 aminoácidos, o aproximadamente 740 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 740 aminoácidos a aproximadamente 800 aminoácidos, aproximadamente 780 aminoácidos, o aproximadamente 760 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 760 aminoácidos a aproximadamente 800 aminoácidos, o aproximadamente 780 aminoácidos (inclusive); o aproximadamente 780 aminoácidos a aproximadamente 800 aminoácidos (inclusive).
- 25 En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos intermedios entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas pueden ser o incluir un péptido conector. En algunas formas de realización, un péptido conector puede incluir una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 20), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 21), RSGSGSGS (SEQ ID NO: 22) o GSGSGSGS (SEQ ID NO: 23). En algunas formas de realización, el péptido conector puede estar codificado por una o más de las siguientes secuencias de ácidos nucleicos:
- 30 GGATCCGGCAGCGATCTGGCAGTGAAGC (SEQ ID NO: 24), GGATCTGGCTCTGGAAGCGGCAGC (SEQ ID NO: 25), AGATCCGGATCTGGAAGTGGCTCC (SEQ ID NO: 26) o GGAAGTGGATCTGGGAGCGGCTCT (SEQ ID NO: 27). En algunas formas de realización, un péptido conector puede incluir una o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) copias de cualquiera de las SEQ ID NO: 20-23, por ejemplo, en tándem.
- 35 En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos intermedios entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas pueden ser o incluir una secuencia intracelular que linda con el dominio transmembrana en el polipéptido endógeno del cual se deriva el dominio transmembrana (por ejemplo, cualquiera de los dominios transmembrana descritos en este documento). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos intermedios entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas pueden ser o
- 40 incluir uno o más dominios adicionales (por ejemplo, cualquiera de los dominios adicionales ejemplares descritos en este documento o conocidos en la técnica). En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única puede ser un receptor de antígeno quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento). En algunas formas de realización, el polipéptido quimérico puede incluir además uno o más dominios adicionales. Los ejemplos no limitantes de dominios adicionales que se pueden incluir en un polipéptido quimérico de cadena única incluyen uno o más de: un dominio de unión de ligando extracelular (por ejemplo,
- 45 un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en este documento), un ITIM (por ejemplo, cualquiera de los ITIM conocidos en la técnica), un ITAM (por ejemplo, cualquiera de los ITAM descritos en este documento o conocidos en la técnica), un dominio de dimerización (por ejemplo, capaz de dimerizarse con otro dominio de dimerización presente en otro polipéptido (por ejemplo, un polipéptido recombinante)
- 50 expresado en una célula de mamífero, por ejemplo, cualquiera de los dominios de dimerización conocidos en la técnica) y una etiqueta de péptido (por ejemplo, una etiqueta de poli-His).

Polipéptido quimérico de cadena única - Receptor de hormona extracelular LBD

- 55 Se describen en este documento polipéptidos quiméricos de cadena única que incluyen un dominio de unión de ligando de receptor de hormona extracelular (por ejemplo, cualquiera de los dominios de unión de ligando de receptor de hormona descritos en este documento o conocidos en la técnica) y un dominio transmembrana (por ejemplo, cualquiera de los dominios transmembrana descritos en este documento o conocidos en la técnica), donde el dominio transmembrana y el dominio de unión de ligando de receptor de hormona extracelular se encuentran directamente adyacentes entre sí o están
- 60 separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (por ejemplo, o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento), y el dominio transmembrana y el dominio de unión de ligando de receptor de hormona no están ambos presentes en un solo polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero (por ejemplo, un ser humano).
- 65 En algunos ejemplos de polipéptidos quiméricos de cadena única, el dominio transmembrana linda directamente con el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas (es decir, no hay aminoácidos intermedios entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelular). En algunos ejemplos de

polipéptidos quiméricos de cadena única, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular están separados por: 1 aminoácido a aproximadamente 800 aminoácidos (por ejemplo, cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento)

En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos intermedios entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular pueden ser o incluir un péptido conector. En algunas formas de realización, un péptido conector puede incluir una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 20), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 21), RSGSGSGS (SEQ ID NO: 22) o GSGSGSGS (SEQ ID NO: 23). En algunas formas de realización, el péptido conector puede estar codificado por una o más de las siguientes secuencias de ácidos nucleicos: GGATCCGGCAGCGGATCTGGCAGTGGAAAGC (SEQ ID NO: 24), GGATCTGGCTCTGGAAGCGGCAGC (SEQ ID NO: 25), AGATCCGGATCTGGAAGTGGCTCC (SEQ ID NO: 26) o GGAAGTGGATCTGGGAGCGGCTCT (SEQ ID NO: 27). En algunas formas de realización, un péptido conector puede incluir una o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) copias de cualquiera de las SEQ ID NO: 20-23, por ejemplo, en tándem. En algunas formas de realización, un péptido conector puede ser o puede incluir uno o más de los SEQ ID NO: 45, 47, 49, 58, 60, 62 y 106. En algunas formas de realización, un péptido conector puede ser o incluir GS.

En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos intermedios entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares pueden ser o incluir una secuencia que linda con el dominio transmembrana en el polipéptido endógeno del cual se deriva el dominio transmembrana (por ejemplo, cualquiera de los dominios transmembrana descritos en este documento). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos intermedios entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular pueden ser o incluir uno o más dominios adicionales (por ejemplo, cualquiera de los dominios adicionales ejemplares descritos en este documento o conocidos en la técnica). En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única puede ser un receptor de antígeno quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento). En algunas formas de realización, el polipéptido quimérico puede incluir además uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) dominios adicionales. Los ejemplos no limitantes de dominios adicionales que se pueden incluir en un polipéptido quimérico de cadena única incluyen uno o más de: un dominio de unión de ligando extracelular (por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en este documento), un ITIM (por ejemplo, cualquiera de los ITIM conocidos en la técnica), un ITAM (por ejemplo, cualquiera de los ITAM descritos en este documento o conocidos en la técnica), un dominio de dimerización (por ejemplo, capaz de dimerizarse con otro dominio de dimerización presente en otro polipéptido (por ejemplo, un polipéptido recombinante) expresado en una célula de mamífero, por ejemplo, cualquiera de los dominios de dimerización conocidos en la técnica) y una etiqueta de péptido (por ejemplo, una etiqueta de poli-His).

En algunas formas de realización, cuando va en la dirección N-terminal a C-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única incluye el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelulares y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, cuando va en la dirección C-terminal a la N-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única comprende el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, cuando va en la dirección N-terminal a la C-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única incluye el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, cuando va en la dirección C-terminal a la N-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única incluye el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana.

Receptor de antígeno quimérico de cadena única

Receptor de antígeno quimérico de cadena única - Receptor de hormona intracelular LBD

También se divulgan en este documento receptores de antígeno quiméricos de cadena única que incluyen: un dominio de unión a antígeno extracelular (p. ej., cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en este documento o conocidos en la técnica), un dominio transmembrana (p. ej., cualquiera de los dominios transmembrana descritos en este documento o conocidos en la técnica), un dominio de unión de ligando de receptor de hormona (p. ej., cualquiera de los dominios de unión de ligando de receptor de hormona descritos en este documento o conocidos en la técnica), un dominio coestimulador (p. ej., cualquiera de los dominios coestimuladores descritos en este documento o conocidos en la técnica) y un motivo de activación basado en tirosina de inmunoceptor (ITAM), donde: el dominio transmembrana y el dominio de unión de ligando de hormona se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (p. ej., cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento), y el dominio transmembrana y el dominio de unión de ligando de hormona El dominio de unión del ligando del receptor no está presente en el mismo (un solo) polipéptido endógeno de cadena única en un mamífero. Los receptores de antígenos quiméricos de cadena única descritos en este documento pueden unirse a cualquiera de los antígenos ejemplares descritos en este documento o a cualquier otro antígeno conocido en la técnica. En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico de cadena única se une específicamente a un solo antígeno (por ejemplo, cualquiera de los antígenos ejemplares descritos en este documento). En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico de cadena única se une específicamente a dos antígenos diferentes (por ejemplo, cualquier combinación de los antígenos ejemplares descritos en este documento).

- En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única, el dominio transmembrana linda con el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas. En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas están separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (por ejemplo, o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento). En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas no comprenden un dominio. En otras formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas incluyen uno o más dominios intermedios (por ejemplo, uno o más dominios coestimuladores y/o uno o más ITAM). En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas incluyen una secuencia de la misma proteína transmembrana endógena de la que se deriva el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas incluyen una secuencia de enlace.
- Algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única pueden incluir uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) dominios coestimuladores (por ejemplo, cualquier combinación de cualquiera de los dominios coestimuladores ejemplares descritos en este documento o conocidos en la técnica). Algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única incluyen uno o ambos de un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio coestimulador CD28.
- Algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única pueden incluir uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) ITAM (por ejemplo, cualquiera de los ITAM descritos en este documento o conocidos en la técnica). En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única, el ITAM incluye una secuencia de señalización citoplasmática de CD3 ζ (por ejemplo, CD3 ζ humano).
- En algunas formas de realización de cualquiera de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única, dos dominios vecinos cualesquiera pueden estar separados por 1 aminoácido a aproximadamente 500 aminoácidos (por ejemplo, o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento).
- En algunas formas de realización de cualquiera de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única, dos dominios vecinos cualesquiera pueden estar separados por 1 aminoácido hasta aproximadamente 500 aminoácidos, aproximadamente 480 aminoácidos, aproximadamente 460 aminoácidos, aproximadamente 440 aminoácidos, aproximadamente 420 aminoácidos, aproximadamente 400 aminoácidos, aproximadamente 380 aminoácidos, aproximadamente 360 aminoácidos, aproximadamente 340 aminoácidos, aproximadamente 320 aminoácidos, aproximadamente 300 aminoácidos, aproximadamente 280 aminoácidos, aproximadamente 260 aminoácidos, aproximadamente 240 aminoácidos, aproximadamente 220 aminoácidos, aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 190 aminoácidos, aproximadamente 180 aminoácidos, aproximadamente 170 aminoácidos, aproximadamente 160 aminoácidos, aproximadamente 150 aminoácidos, aproximadamente 140 aminoácidos, aproximadamente 130 aminoácidos, aproximadamente 120 aminoácidos, aproximadamente 110 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 95 aminoácidos, aproximadamente 90 aminoácidos, aproximadamente 85 aminoácidos, aproximadamente 80 aminoácidos, aproximadamente 75 aminoácidos, aproximadamente 70 aminoácidos, aproximadamente 65 aminoácidos, aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 55 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 45 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos, aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 25 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 8 aminoácidos, aproximadamente 6 aminoácidos, aproximadamente 4 aminoácidos, o aproximadamente 3 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 2 aminoácidos a aproximadamente 500 aminoácidos, aproximadamente 480 aminoácidos, aproximadamente 460 aminoácidos, aproximadamente 440 aminoácidos, aproximadamente 420 aminoácidos, aproximadamente 400 aminoácidos, aproximadamente 380 aminoácidos, aproximadamente 360 aminoácidos, aproximadamente 340 aminoácidos, aproximadamente 320 aminoácidos, aproximadamente 300 aminoácidos, aproximadamente 280 aminoácidos, aproximadamente 260 aminoácidos, aproximadamente 240 aminoácidos, aproximadamente 220 aminoácidos, aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 190 aminoácidos, aproximadamente 180 aminoácidos, aproximadamente 170 aminoácidos, aproximadamente 160 aminoácidos, aproximadamente 150 aminoácidos, aproximadamente 140 aminoácidos, aproximadamente 130 aminoácidos, aproximadamente 120 aminoácidos, aproximadamente 110 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 95 aminoácidos, aproximadamente 90 aminoácidos, aproximadamente 85 aminoácidos, aproximadamente 80 aminoácidos, aproximadamente 75 aminoácidos, aproximadamente 70 aminoácidos, aproximadamente 65 aminoácidos, aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 55 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 45 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos, aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 25 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 8 aminoácidos, aproximadamente 6 aminoácidos, o aproximadamente 4 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 3 aminoácidos a aproximadamente 500 aminoácidos, aproximadamente 480 aminoácidos, aproximadamente 460 aminoácidos, aproximadamente 440 aminoácidos, aproximadamente 420 aminoácidos, aproximadamente 400 aminoácidos, aproximadamente 380 aminoácidos, aproximadamente 360 aminoácidos, aproximadamente 340 aminoácidos, aproximadamente 320 aminoácidos, aproximadamente 300 aminoácidos, aproximadamente 280 aminoácidos,

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana es una secuencia del mismo polipéptido endógeno de cadena única del que se deriva el dominio transmembrana (por ejemplo, una región bisagra de CD8 α , por ejemplo, SEQ ID NO: 112). En algunas formas de realización, una secuencia que comprende SEQ ID NO: 42, 55 o 112 está posicionada entre el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana es o incluye una secuencia de región bisagra de un anticuerpo tal como, sin limitación, un anticuerpo humano (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana es o comprende una secuencia de enlace (p. ej., una secuencia de enlace que no se produce de forma natural, p. ej., GS o cualquiera de las otras secuencias de enlace descritas en el presente documento).

En algunas formas de realización de los receptores de antígenos quiméricos de cadena únicas, después del dominio de unión al ligando del receptor de hormonas, el siguiente dominio es un dominio coestimulador seguido de un ITAM. En algunas de estas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas y el dominio coestimulador es o incluye una secuencia del mismo polipéptido de cadena única endógeno del que se deriva el dominio coestimulador o del que se deriva el ITAM. En algunas de estas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas y el dominio coestimulador es o incluye una secuencia de enlace (p. ej., una secuencia de enlace que no se produce de forma natural). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio coestimulador y el ITAM es o incluye una secuencia del mismo polipéptido endógeno de cadena única del cual se deriva el dominio coestimulador o del cual se deriva el ITAM.

En algunas formas de realización de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única, después del dominio de unión del ligando del receptor de hormonas, el siguiente dominio es un dominio coestimulador seguido de un ITAM. En algunas formas de realización de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única, después del dominio de unión del ligando, el siguiente dominio es un ITAM, seguido del dominio coestimulador. En algunas de estas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas y el ITAM es o incluye una secuencia del mismo polipéptido endógeno de cadena única del cual se deriva el dominio coestimulador o del cual se deriva el ITAM. En algunas de estas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas y el ITAM es o incluye una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el ITAM y el dominio coestimulador es o incluye una secuencia del mismo polipéptido endógeno de cadena única del que se deriva el ITAM o se deriva el dominio coestimulador.

En algunas formas de realización, cuando se incluyen dos o más dominios coestimuladores en el receptor de antígeno quimérico de cadena única, los dos o más dominios coestimuladores se pueden colocar entre el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas y uno o más ITAM. En algunas formas de realización de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en el presente documento, los dominios coestimuladores y los ITAM pueden alternarse en la secuencia de aminoácidos primaria del receptor de antígeno quimérico de cadena única.

Algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de cadena únicas descritos en el presente documento pueden incluir además un dominio de dimerización y/o una etiqueta peptídica.

En algunos ejemplos, un receptor de antígenos quiméricos de cadena únicas puede comprender una secuencia que es al menos un 80 % (p. ej., al menos un 82 %, al menos un 84 %, al menos un 86 %, al menos un 88 %, al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 94 %, al menos un 96 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o 100 %) idéntica a: SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39 o 52.

Receptor de antígeno quimérico de cadena única - Receptor de hormona extracelular LBD

También se describen en este documento receptores de antígenos quiméricos de cadena única que incluyen: un dominio de unión a antígeno extracelular (p. ej., cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en este documento o conocidos en la técnica), un dominio de unión a ligando de receptor de hormona extracelular (p. ej., cualquiera de los dominios de unión a ligando de receptor de hormona descritos en este documento o conocidos en la técnica), un dominio transmembrana (p. ej., cualquiera de los dominios transmembrana descritos en este documento o conocidos en la técnica), un dominio coestimulador (p. ej., cualquiera de los dominios coestimuladores descritos en este documento o conocidos en la técnica) y un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM), donde: el dominio transmembrana y el dominio de unión a ligando de hormona extracelular se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (p. ej., cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento), y el dominio transmembrana y el dominio de unión a ligando de receptor de hormona extracelular no están presentes en el mismo dominio endógeno. polipéptido de cadena única en un mamífero. Los receptores de antígenos quiméricos de cadena únicas descritos en el presente documento pueden unirse a cualquiera de los antígenos ejemplares descritos en el presente documento o a cualquier otro antígeno conocido en la técnica. En algunas formas de realización, el receptor de antígenos quiméricos de cadena únicas se une específicamente a un único antígeno (p. ej., cualquiera de los antígenos ejemplares descritos en el presente documento). En algunas formas de realización, el receptor de antígenos quiméricos de cadena únicas se une específicamente a dos antígenos diferentes (p. ej., cualquier combinación de los antígenos ejemplares descritos en el presente documento).

En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena únicas, el dominio transmembrana linda con el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares. En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena únicas, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares están separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (p. ej., o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en el presente documento). En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares no comprenden un dominio. En otras formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares incluyen uno o más dominios intermedios (por ejemplo, el dominio de unión al antígeno o un dominio de unión al antígeno adicional). En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares incluyen una secuencia de la misma proteína transmembrana endógena de la que se deriva el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares incluyen una secuencia de enlace.

Algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única pueden incluir uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) dominios coestimuladores (por ejemplo, cualquier combinación de cualquiera de los dominios coestimuladores ejemplares descritos en este documento o conocidos en la técnica). Algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única incluyen uno o ambos de un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio coestimulador CD28.

Algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única pueden incluir uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) ITAM (por ejemplo, cualquiera de los ITAM descritos en este documento o conocidos en la técnica). En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única, el ITAM incluye una secuencia de señalización citoplasmática de CD3ζ (p. ej., CD3ζ humano).

En algunas formas de realización de cualquiera de estos receptores de antígenos quiméricos de cadena única, dos dominios vecinos cualesquiera pueden estar separados por 1 aminoácido a aproximadamente 500 aminoácidos (p. ej., o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en el presente documento).

En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular o el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana es una secuencia del mismo polipéptido endógeno de cadena única del que se deriva el dominio transmembrana (p. ej., una secuencia bisagra de CD8α humano, p. ej., SEQ ID NO: 112). En algunas formas de realización, una secuencia que comprende SEQ ID NO: 42, 55 o 112 se coloca entre el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular o el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno extracelular o el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelular y el dominio transmembrana es o incluye una secuencia de región bisagra de un anticuerpo tal como, sin limitación, un anticuerpo humano (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno extracelular o el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelular (por ejemplo, cualquiera de los dominios de unión al ligando del receptor de hormonas descritos en este documento o conocidos en la técnica) y el dominio transmembrana es o comprende una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelular es o comprende una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural, por ejemplo, GS o cualquiera de las otras secuencias de enlace descritas en este documento)).

En algunas formas de realización de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única, después del dominio transmembrana, el siguiente dominio es un dominio coestimulador seguido de un ITAM. En algunas formas de realización de los receptores de antígenos quiméricos de cadena única, después del dominio transmembrana, el siguiente dominio es un ITAM, seguido del dominio coestimulador. En algunas de estas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio coestimulador o el ITAM es o incluye una secuencia del mismo polipéptido de cadena única endógeno del que se deriva el dominio coestimulador o se deriva el ITAM, respectivamente. En algunas de estas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio coestimulador o el ITAM es o incluye una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural). En algunas de estas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio coestimulador y el ITAM es o incluye una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio coestimulador y el ITAM es o incluye una secuencia del mismo polipéptido endógeno de cadena única del que se deriva el dominio coestimulador o del que se deriva el ITAM.

En algunas formas de realización, cuando se incluyen dos o más dominios coestimuladores en el receptor de antígeno quimérico de cadena única, los dos o más dominios coestimuladores se pueden colocar entre uno o más ITAM. En algunas formas de realización, cuando se incluyen dos o más ITAM en el receptor de antígeno quimérico de cadena única, los dos o más ITAM se pueden colocar entre una o más moléculas coestimuladoras. En algunas formas de realización de los receptores de antígeno quimérico de cadena única descritos en el presente documento, los dominios coestimuladores y los ITAM pueden alternarse en la secuencia de aminoácidos primaria del receptor de antígeno quimérico de cadena única.

Algunas formas de realización de cualquiera de los receptores de antígeno quimérico de cadena única descritos en el presente documento pueden incluir además un dominio de dimerización y/o una etiqueta de péptido.

- 5 En algunas formas de realización, cuando va en la dirección N-terminal a C-terminal, el receptor de antígeno quimérico de cadena única comprende el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio transmembrana, el dominio coestimulador intracelular y el ITAM. En algunas formas de realización, cuando va en la dirección C-terminal a la N-terminal, el receptor de antígeno quimérico de cadena única comprende el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio transmembrana, el dominio coestimulador intracelular y el ITAM. En algunas formas de realización, cuando va en la dirección N-terminal a C-terminal, el receptor de antígeno quimérico de cadena única comprende el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión del antígeno extracelular, el dominio transmembrana, el dominio coestimulador intracelular y el ITAM. En algunas formas de realización, cuando va en la dirección C-terminal a la N-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única comprende el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio transmembrana, el dominio coestimulador intracelular y el ITAM.

En algunos ejemplos, un receptor de antígeno quimérico de cadena única puede comprender una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, al menos 82 %, al menos 84 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 96 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 %) idéntica a SEQ ID NO: 98.

Receptor de antígeno quimérico multicadena

Receptores de antígeno quimérico multicadena - Receptor de hormona intracelular LBD

- 25 También se divulgan en este documento receptores de antígeno quimérico multicadena que incluyen al menos un primer polipéptido que incluye: un dominio de unión a antígeno extracelular (por ejemplo, cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en este documento o conocidos en la técnica), un dominio transmembrana (por ejemplo, cualquiera de los dominios transmembrana descritos en este documento o conocidos en la técnica) y un dominio de unión de ligando de receptor de hormona (por ejemplo, cualquiera de los dominios de unión de ligando de receptor de hormona descritos en este documento o conocidos en la técnica), donde el dominio transmembrana y el dominio de unión de ligando de receptor de hormona se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (por ejemplo, cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento), y el dominio transmembrana y el dominio de unión de ligando de receptor de hormona no están ambos presentes en el mismo (un solo) polipéptido de cadena única endógeno. El antígeno unido específicamente por el dominio de unión al antígeno en cualquiera de estos receptores de antígenos quiméricos multicadena puede ser cualquiera de los antígenos descritos en este documento o conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico multicadena solo se une específicamente a un solo antígeno (por ejemplo, cualquiera de los antígenos ejemplares descritos en este documento). En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico multicadena se une específicamente a dos antígenos diferentes (por ejemplo, cualquier combinación de cualquiera de los antígenos ejemplares descritos en este documento).

- En algunas formas de realización de los receptores de antígenos quiméricos multicadena, el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana en el al menos un primer polipéptido se encuentran uno junto al otro. En algunas formas de realización de los receptores de antígenos quiméricos multicadena, de 1 a aproximadamente 500 aminoácidos (por ejemplo, cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento) se encuentran entre el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana en el al menos un primer polipéptido. En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana en el al menos un primer polipéptido es una secuencia del mismo polipéptido endógeno de cadena única del que se deriva el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana del al menos un primer polipéptido es o incluye una secuencia de región bisagra de anticuerpo humano (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana en el al menos un primer polipéptido es o incluye una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural).

- En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos multicadena, el dominio transmembrana linda con el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas en el al menos un primer polipéptido. En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos multicadena, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas en el al menos un primer polipéptido están separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (por ejemplo, o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento). En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas en el al menos un primer polipéptido no comprenden un dominio. En otras formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas en el al menos un primer polipéptido incluyen uno o más dominios intermedios (por ejemplo, uno o más dominios coestimuladores (por ejemplo, cualquiera de los dominios coestimuladores descritos en este documento) y/o uno o más ITAM (por ejemplo, cualquiera de los ITAM descritos en este documento). En algunas formas de realización, los

aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas en el al menos un primer polipéptido incluyen una secuencia de la misma proteína transmembrana endógena de la que se deriva el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas en el al menos un primer polipéptido incluyen una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural).

En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos multicadena, el al menos un primer polipéptido puede incluir además uno o más (por ejemplo, dos o tres) de: un dominio dimerizante (por ejemplo, cualquier dominio dimerizante conocido en la técnica), un dominio coestimulador (por ejemplo, cualquiera de los dominios coestimuladores descritos en este documento) y/o una etiqueta peptídica (por ejemplo, cualquier etiqueta peptídica conocida en la técnica).

Algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos multicadena incluyen, además, un segundo polipéptido que puede incluir uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) de: un dominio transmembrana (por ejemplo, cualquiera de los dominios transmembrana descritos en este documento), un dominio dimerizante (por ejemplo, un dominio dimerizante que puede interactuar con un dominio dimerizante en el al menos un primer polipéptido en una célula de mamífero), uno o más dominios coestimuladores (por ejemplo, cualquiera de los dominios coestimuladores descritos en este documento) y uno o más ITAM (por ejemplo, cualquiera de los ITAM descritos en este documento). Como pueden apreciar los expertos en la materia, un par o cada par de dominios vecinos en el segundo polipéptido pueden colindar entre sí o pueden estar separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (por ejemplo, cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento). El uno o más aminoácidos entre un par de dominios vecinos en el segundo polipéptido pueden ser una secuencia de un polipéptido endógeno de cadena única del cual se ha derivado un dominio transmembrana, un dominio coestimulador o un ITAM presente en el segundo polipéptido.

Receptores de antígeno quiméricos multicadena - LBD del receptor de hormonas extracelulares

También se divulgan en este documento receptores de antígenos quiméricos multicadena que incluyen al menos un primer polipéptido que incluye: un dominio de unión a antígeno extracelular (por ejemplo, cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en este documento o conocidos en la técnica), un dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelular (por ejemplo, cualquiera de los dominios de unión al ligando del receptor de hormonas descritos en este documento o conocidos en la técnica) y un dominio transmembrana (por ejemplo, cualquiera de los dominios transmembrana descritos en este documento o conocidos en la técnica), donde el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelular se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (por ejemplo, cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento), y el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas no están presentes en un único polipéptido de cadena única endógeno. El antígeno unido específicamente por el dominio de unión al antígeno en cualquiera de estos receptores de antígenos quiméricos multicadena puede ser cualquiera de los antígenos descritos en este documento o conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico multicadena solo se une específicamente a un solo antígeno (por ejemplo, cualquiera de los antígenos ejemplares descritos en este documento). En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico multicadena se une específicamente a dos antígenos diferentes (por ejemplo, cualquier combinación de cualquiera de los antígenos ejemplares descritos en este documento).

En algunas formas de realización de los receptores de antígenos quiméricos multicadena, el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio transmembrana en el al menos un primer polipéptido se encuentran uno junto al otro. En algunas formas de realización de los receptores de antígenos quiméricos multicadena, de 1 a aproximadamente 700 aminoácidos (por ejemplo, cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento) se encuentran entre el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio transmembrana en el al menos un primer polipéptido. En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares y el dominio transmembrana en el al menos un primer polipéptido es una secuencia del mismo polipéptido endógeno de cadena única del que se deriva el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares y el dominio transmembrana del al menos un primer polipéptido es o incluye una secuencia de región bisagra de anticuerpo humano (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares y el dominio transmembrana en el al menos un primer polipéptido es o incluye una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio de unión al antígeno es o incluye una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural).

En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos multicadena, el dominio transmembrana linda con el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular en el al menos un primer polipéptido. En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos multicadena, el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular en el al menos un primer polipéptido están separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (por ejemplo, o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este

documento). En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares en el al menos un primer polipéptido no comprenden un dominio.

En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelulares en el al menos un primer polipéptido incluyen uno o más dominios intermedios (por ejemplo, el dominio de unión al antígeno). En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión al antígeno en el al menos un primer polipéptido incluyen una secuencia de la misma proteína transmembrana endógena de la que se deriva el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, los aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión al antígeno en el al menos un primer polipéptido incluyen una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno y el dominio transmembrana del al menos un primer polipéptido es o incluye una secuencia de región bisagra de anticuerpo humano (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas formas de realización, uno o más aminoácidos entre el dominio de unión al antígeno y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas extracelulares en el al menos un primer polipéptido es o incluye una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural).

En algunas formas de realización, cuando se va en la dirección N-terminal a C-terminal, el al menos un primer polipéptido comprende el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, cuando se va en la dirección C-terminal a N-terminal, el al menos un primer polipéptido comprende el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión al ligando del receptor de hormona extracelular y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, cuando se va en la dirección N-terminal a C-terminal, el al menos un primer polipéptido comprende el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana. En algunas formas de realización, cuando se va en la dirección C-terminal a N-terminal, el al menos un primer polipéptido comprende el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular, el dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio transmembrana.

En algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos multicadena, el al menos un primer polipéptido puede incluir además uno o más (por ejemplo, dos o tres) de: un dominio dimerizante (por ejemplo, cualquier dominio dimerizante conocido en la técnica), un dominio coestimulador (por ejemplo, cualquiera de los dominios coestimuladores descritos en este documento) y/o una etiqueta peptídica (por ejemplo, cualquier etiqueta peptídica conocida en la técnica).

Algunas formas de realización de estos receptores de antígenos quiméricos multicadena incluyen, además un segundo polipéptido que puede incluir uno o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro, en cualquier orden o combinación) de: un dominio transmembrana (por ejemplo, cualquiera de los dominios transmembrana descritos en este documento), un dominio dimerizante (por ejemplo, un dominio dimerizante que puede interactuar con un dominio dimerizante en el al menos un primer polipéptido en una célula de mamífero), uno o más dominios coestimuladores (por ejemplo, cualquiera de los dominios coestimuladores descritos en este documento) y uno o más ITAM (por ejemplo, cualquiera de los ITAM descritos en este documento). Como pueden apreciar los expertos en la materia, un par o cada par de dominios vecinos en el segundo polipéptido pueden colindar entre sí o pueden estar separados por 1 a aproximadamente 800 aminoácidos (por ejemplo, cualquiera de los subrangos de este rango descritos en este documento). El uno o más aminoácidos entre un par de dominios vecinos en el segundo polipéptido pueden ser una secuencia de un polipéptido endógeno de cadena única del cual se ha derivado un dominio transmembrana, un dominio coestimulador o un ITAM presente en el segundo polipéptido. El uno o más aminoácidos entre un par de dominios vecinos en el segundo polipéptido pueden ser o incluir una secuencia de enlace (por ejemplo, una secuencia de enlace que no se produce de forma natural).

Como se puede apreciar en la técnica, los dos o más polipéptidos presentes en un receptor de antígeno quimérico multicadena pueden asociarse a través de un par de dominios que interactúan entre sí (a través de dominios dimerizantes). En algunas formas de realización, la interacción entre dominios dimerizantes puede desencadenarse mediante la adición de una molécula pequeña. En algunas formas de realización, los dos o más polipéptidos presentes en un receptor de antígeno quimérico multimérico pueden asociarse a través de interacciones no covalentes (por ejemplo, entre asociaciones entre dominios dimerizantes). En algunas formas de realización, los dos o más polipéptidos presentes en un receptor de antígeno quimérico multimérico pueden ser a través de una interacción covalente (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro, a través de un enlace éster, a través de un enlace amida, a través de un enlace tioéster o una combinación de los mismos).

Dominios transmembrana

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio transmembrana, o una porción del mismo, de un polipéptido endógeno, donde el polipéptido endógeno se selecciona del grupo g de: una cadena α de un receptor de células T, una cadena β del receptor de células T, una cadena ζ del receptor de células T, CD28 (también conocido como Tp44), CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37 (también conocido como GP52-40 o TSPAN26), CD64 (también conocido como FCGR1A), CD80 (también conocido como B7, B7-1, B7.1, BB1, CD28LG, CD28LG1 y LAB7), CD45 (también conocido

- como PTPRC, B220, CD45R, GP180, L-CA, LCA, LY5, T200 y proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo C), CD4, CD5 (también conocido como LEU1 y T1), CD8 α (también conocido como Leu2, MAL y p32), CD9 (también conocido como BTCC-1, DRAP-27, MIC3, MRP-1, TSPAN-29 y TSPAN29), CD16 (también conocido como FCGR3 y FCG3), CD22 (también conocido como SIGLEC-2 y SIGLEC2), CD86 (también conocido como B7-2, B7.2, B70, CD28LG2 y LAB72),
5 CD134 (también conocido como TNFRSF4, ACT35, RP5-902P8.3, IMD16, OX40, TXGPIL y miembro 4 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral), CD137 (también conocido como TNFRSF9, 4-1BB, CDw137, ILA y miembro 9 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral), CD27 (también conocido como S152, S152.LPFS2, T14, TNFRSF7 y Tp55), CD152 (también conocido como CTLA4, ALPS5, CELIAC3, CTLA-4, GRD4, GSE, IDDM12 y citotóxico Proteína asociada a linfocitos T 4), PD1 (también conocida como PDCD1, CD279, PD-1, SLEB2, hPD-1, hPD-1, hSLE1 y muerte celular programada 1), ICOS (también conocida como AILIM, CD278 y CVIDI), CD272 (también conocida como BTLA y BTLAI), CD30 (también conocida como TNFRSF8, D1S166E y Ki-1), G1TR (también conocida como TNFRSF18, RP5-902P8.2, AITR, CD357 y G1TR-D), HVEM (también conocida como TNFRSF14, RP3-395M20.6, ATAR, CD270, HVEA, HVEM, LIGHTR y TR2), DAPIO y CD154 (también conocida como CD40LG, CD40L, HIGMI, IGM, IMD3, T-BAM, TNFSF5, TRAP, gp39, hCD40L y ligando CD40). Las letras "CD" en la oración anterior significan "grupo de diferenciación".
10 Por ejemplo, CD3 significa "grupo de diferenciación 3". En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio transmembrana, o una porción del mismo, de un polipéptido endógeno de mamífero (por ejemplo, humano) (por ejemplo, un homólogo de mamífero o humano de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente).
- 20 Cualquier dominio transmembrana, o porción del mismo, que sirva para anclar un polipéptido endógeno en una bicapa lipídica (por ejemplo, membrana plasmática) de una célula de mamífero es adecuado para su uso de acuerdo con las composiciones y métodos descritos en este documento. En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio transmembrana, o una porción del mismo, de CD28 humano, por ejemplo, N.º de acceso P01747, p.
25 ej., aminoácidos 153 a 179 de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico de cadena múltiple incluye un dominio transmembrana que es al menos 80 % (por ejemplo, al menos 82 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntico) a los aminoácidos 153 a 179 de SEQ ID NO: 1, o una porción de la misma.
- 30 En algunas formas de realización, el dominio transmembrana puede comprender una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, al menos 82 %, al menos 84 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 96 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica) a SEQ ID NO: 114 (o una porción de la misma).
- 35 **SEQ ID NO: 1**
MLRLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYS
KTGFNCDDGKLGNESVTFLYNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVG
VLACYSLLVTVAFIIFWRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
- 40 En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio transmembrana, o una porción del mismo, de CD3 humano, p. ej., N.º de acceso P20963, p. ej., aminoácidos 31 a 51 de SEQ ID NO: 2. En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio transmembrana que es o incluye una secuencia que es al menos
45 80 % (por ejemplo, al menos 82 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica) a los aminoácidos 31 a 51 de SEQ ID NO: 2.
- SEQ ID NO: 2**
50 MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR
- 55 En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio transmembrana, o una porción del mismo, de cualquiera de las SEQ ID Nos. 3-9.
- 60 LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC (SEQ ID NO: 3);
VAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL (SEQ ID NO: 4);
ALIVLGGVAGLLFIGLGIFFCVRC (SEQ ID NO: 5);
LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV (SEQ ID NO: 6);
WVLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 7);
IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 8); y
ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA (SEQ ID NO: 9)
- 65

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico de cadena múltiple incluye un dominio transmembrana que es o incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, al menos 82 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica) a cualquiera de las SEQ ID Nos. 3-9.

5

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico de cadena múltiple incluye un dominio transmembrana que es o incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, al menos 82 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica) a SEQ ID NO: 43, 56 o 114.

10

Como apreciarán los expertos en la materia, ciertos polipéptidos endógenos tienen dos o más isoformas que difieren al menos en su secuencia polipeptídica primaria. Un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena descrito en este documento puede incluir un dominio transmembrana que incluye una secuencia de aminoácidos de cualquier isoforma de una proteína transmembrana endógena (por ejemplo, una proteína transmembrana endógena de mamífero, por ejemplo, humana) que incluye, por ejemplo, una isoforma (por ejemplo, una isoforma humana) de: una cadena α de un receptor de células T, una cadena β del receptor de células T, una cadena ζ del receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137, CD27, CD152, PD1 o CD154.

15

20

En algunas formas de realización, un dominio transmembrana, o una porción del mismo, de un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con los dominios transmembrana de una o más de las siguientes proteínas transmembrana endógenas de mamíferos (por ejemplo, humanos):

25

una cadena α de un receptor de células T, una cadena β del receptor de células T, una cadena ζ del receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137, CD27, CD152, PD1 o CD154. En algunas formas de realización, un dominio transmembrana, o una porción del mismo, de un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con el dominio transmembrana de una proteína transmembrana endógena de mamífero (por ejemplo, humana): una cadena α de un receptor de células T, una cadena β del receptor de células T, una cadena ζ del receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137, CD27, CD152, PDI o CD154.

30

35

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio transmembrana sintético. En algunos casos, un dominio transmembrana sintético puede incluir residuos predominantemente hidrófobos como, sin limitación, leucina y valina. En algunas formas de realización, un dominio transmembrana sintético incluye un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo del dominio.

40

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio transmembrana que es un dominio transmembrana quimérico que tiene porciones de un dominio transmembrana de dos o más polipéptidos transmembrana endógenos de mamíferos (por ejemplo, humanos) tales como, sin limitación, una cadena α de un receptor de células T, una cadena β del receptor de células T, una cadena ζ del receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137, CD27, CD152, PDI y CD154, de modo que las dos o más porciones de dominios transmembrana juntas constituyen un dominio transmembrana funcional. En algunas formas de realización, dicha porción de un dominio transmembrana quimérico puede incluir una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una porción correspondiente de un dominio transmembrana de tipo salvaje.

45

50

Un dominio transmembrana puede incluir una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez secuencias de aminoácidos contiguas que atraviesan cada una una bicapa lipídica cuando están presentes en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresan en una célula de mamífero.

55

Como se sabe en la técnica, un dominio transmembrana puede, por ejemplo, incluir al menos una (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) secuencia de aminoácidos contigua (que atraviesa una bicapa lipídica cuando está presente en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresa en una célula de mamífero) que tiene una estructura secundaria α -helicoidal en la bicapa lipídica. En algunas formas de realización, un dominio transmembrana puede incluir dos o más secuencias de aminoácidos contiguas (que atraviesan cada una una bicapa lipídica cuando están presentes en el polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresan en una célula de mamífero) que forman una estructura secundaria de barril en la bicapa lipídica. Se conocen en la técnica ejemplos y características adicionales de dominios transmembrana.

60

65

Dominios de unión del ligando del receptor de hormonas

En algunas formas de realización, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es o comprende un dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno, o un fragmento del mismo. Ejemplos adicionales de dominios de unión de ligando de receptor de hormona que se pueden usar en cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento (por ejemplo, polipéptido quimérico de cadena única, receptor de antígeno quimérico de cadena única o receptor de antígeno quimérico multicadena) incluyen los dominios de unión de ligando de, por ejemplo, un receptor de estrógeno, un receptor de ecdisona, un receptor PPAR γ , un receptor de glucocorticoides, un receptor de andrógenos, un receptor de hormona tiroidea, un receptor de mineralocorticoides, un receptor de progesterona, un receptor de vitamina D, un receptor PPAR, un receptor PPAR β/δ , un receptor de pregnano X, un receptor de hígado X, un receptor farnesoide X, un receptor de retinoide X, un receptor huérfano relacionado con RAR y un receptor de ácido retinoico.

Un ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de estrógeno humano son los aminoácidos 10 de SEQ ID NO: 10. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 10 a 247 de SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 10 (Humano)

```
1 skknsllslsl tadqmvslall daeppilyse ydptrpfsea smmglltnla drelvhminw
61 akrvpgfvdll thdqvhille cawleilmig lwrsmehepg klfpapnll drnqgkcvge
121 mveifdmlla tssrfmmnl qgeefvclks iillnsgvyt flsstlksle ekdhihrvld
181 kitdtlihl akagltlqqq hqlraqllli lshirhmsnk gmehlysmkc knvvpdydl
241 lemdahrlh
```

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de estrógeno son los aminoácidos 4 a 241 de SEQ ID NO: 11. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 4 a 241 de SEQ ID NO: 11.

SEQ ID NO: 11 (Humano)

```
1 alsttadqmv salldaeppli lyseydptrp fseasmmgll tnladrelvh minwakrvpg
61 fvdllthdqvh hllcawlei lmiglwrsme ehpgklfpap nllldrnqgk cvegmveifd
121 mllatssrfr mmnlqgeefv clksilllns gvytflsstl kslleekdhih rldkitdtl
181 ihlmakaglt lqqqhqlraq lllilshirh msnkgmehly smkcknvvp l ydllemlida
241 hrlhapt
```

En algunas formas de realización, el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno tiene una secuencia de tipo salvaje, excepto que comprende uno o más (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco o seis) sustituciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno tiene una secuencia de tipo salvaje, excepto que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o ambas de las posiciones de aminoácidos 521 (por ejemplo, una sustitución G521R) y 537 (por ejemplo, una sustitución G537F) (cada una numerada en relación con la secuencia de tipo salvaje de longitud completa del receptor de estrógeno humano, por ejemplo, SEQ ID NO: 119 a continuación).

SEQ ID NO: 119 (Humano)

```
1 mtrmtlhtkas gmallhqi qg neleplnrpq lkiplerplg evyldsskpa vynypegaay
61 efnaaaaaana qvygqtglpy gpgseaaafg snglggfppl nsvspslplm lhpppqisplf
121 lqphgqqvpy ylenepsgyt vreagppafy rpsndnrrq grerlastnd kgsmamesak
181 etrycavcnd yasgyhygvw scegckaffk rsiqghndym cpatnqctid knnrkscqac
241 rlrkcyevgm mkggirkdrr ggrmlkhkrq rddgegrgev gsagdmraan lwpsplmikr
301 skknsllslsl tadqmvslall daeppilyse ydptrpfsea smmglltnla drelvhminw
361 akrvpgfvdll thdqvhille cawleilmig lwrsmehepg klfpapnll drnqgkcvge
421 mveifdmlla tssrfmmnl qgeefvclks iillnsgvyt flsstlksle ekdhihrvld
481 kitdtlihl akagltlqqq hqlraqllli lshirhmsnk gmehlysmkc knvvpdydl
541 lemdahrlh aptsrsgasv eedqshlat agstsshsq kyyitgeaeg fpatv
```

Ejemplos no limitantes de un dominio de unión de ligando de receptor de estrógeno pueden incluir una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, al menos 82 %, al menos 84 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 96 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 %) idéntica a: SEQ ID NO: 110 (o un fragmento de la misma).

5 Ejemplos no limitantes adicionales de un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, al menos 82 %, al menos 84 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 96 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 %) idéntica a SEQ ID NO: 46, 59 o 110.

10 Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno son los aminoácidos 314 a 551 de SEQ ID NO: 88. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 314 a 551 de SEQ ID NO: 88.

15 SEQ ID NO: 88 (Ratón)

1 mtmtlhtkas gmallhqiagg neleplnrpq lkmpmralg evyvdnskpt vfnypegaay
61 efnaaaaaaa aasapvygqs giaypggsea aafsanslga fpqlnsvsps plmllhpppq
121 lspflhphgq qvpyylenep sayavrdtgp pafyrnsdn rrqngrerls ssnekgnmim
181 esaketryca vcndyasgyh ygvwscegck affkrsiqgh ndymcpatnq ctidknrrks
20 241 cqacrlrkcy evgmmkggir kdrgrgmlk hkrqrdleg nremgasgdm raanlwpspl
301 vikhtkknsp alsitadqmv salldaepm iyseydpsrp fseasmngll tnladrelvh
361 minwakrvpg fgdlnlhdqv hllcawlei lmiglvwrm ehpgklfap nllldrnqgk
421 cvegmveifd mllatssrfr mmnlqgeefv clksiillns gvytflsstl ksleekdhih
481 rvidkitdtl ihlmakaglt lqqqhrrlaq lllilshirh msnkgmehly nmkcknvvpl
25 541 ydlillemla hrlhapasrm gvppeepsqt qlattssta hslqtyyipp eaegfpnti

30 Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de estrógeno son los aminoácidos 315 a 552 de SEQ ID NO: 89. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 315 a 552 de SEQ ID NO: 89.

35 SEQ ID NO: 89 (Rata)

1 mtmtlhtkas gmallhqiagg neleplnrpq lkmpmralg evyvdnskpa vfnypegaay
61 efnaaaaaaa agasapvygq ssitypggse aaafganslg afpqlnsvsp splmllhppp
121 hvspflhphg hqpyylenep psayavrdtg pafyrnsdn nrrqngrerl ssssekgnmim
181 mesaketryc avcndyasgy hygvwscegc kaffkrsiqg hndymcpatn qctidknrrk
40 241 scqacrlrkcy yevgmmkggi rkdrgrgml khkrqrdle grnemtsgd mraanlwpsp
301 lvikhtkknsp alsitadqmv salldaepm iyseydpsr pfseasmngll tnladrelv
361 hminwakrvp fgdlnlhdq vhllecawle ilmiglvwrm mehpgklfap nllldrnqg
421 kcegmveifd mllatssrfr mmnlqgeef vclksiilln sgvytflsst lksleekdhi
481 hrvidkindt lihlmakaglt lqqqhrrla qllilshirh hmsnkgmehl ynmkcknvvpl
45 541 lydlillemla ahrhapasr mgvppeepsq qlttssts ahsllqtyyipp peaegfpnti

50 Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de estrógeno son los aminoácidos 310 hasta 547 de SEQ ID NO: 90. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 310 a 547 de SEQ ID NO: 90.

55 SEQ ID NO: 90 (Babuino)

1 mtmtlhtkas gmallhqiagg neleplnrpq lkiplerplg evyvdsskpa vysypegaay
61 efnaaaaaana qvygqglpy gpgseaaafg snglggfppl nsvspsplm lhpppqisfp
121 lqphgqqvpy ylenepsgyt vreagppafy rpnndnrrqg grerlastnd kgsamamesak
181 etrycavcnd yasgyhygvw sccegckaffk rsiqghndym cpatnqctid knrrkscqac
60 241 rlrcyevgm mkggirkdrr ggrmlkhkrq rddgegrgev gsagdmraan lwpsplmikh
301 skknspalsi tadqmvsaall daepilyse ydptpfsea smmglltnla drelvhminw
361 akrvpqgfdl thldqvhle cawleilmig lwvrmehpg klfapnlll drnqgkcvag
421 mveifdmlla tssrfrmmnl qgeefvclks iillnsgvyt flsstlksle ekdhihrvid
481 kitdtlihm akagltlqqq hrllaqllli lshirhmsnk gmehlysmkc knvplydli
65 541 lemldahrh aptsggagm eedqshlat agstsshsll kyitgdaeg fpavt

En algunas formas de realización, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es o comprende un receptor de progesterona. unión de ligando dominio, o un fragmento del mismo. Un ejemplo no limitante de un dominio de unión del ligando del receptor de progesterona humano son los aminoácidos 11 a 258 de SEQ ID NO: 12. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 11 a 258 de SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 12 (Humano)

```
1 spgqdiqlip plinllmsie pdviyaghdn tkpdtssll tslnqlgerq llsvvkwsks
61 lpgfrnlhid dqtliqysw mslmvfglw rsykhvsgqm lyfapdliin eqrmkessfy
121 slcltmwqip qefvklqvsq eeflcmkvll lntiplegl rsqtqfeemr ssyirelika
181 iglrqkgvvs ssqrlyqltk lldnlhldvk qhlyclntf iqsralsevf pemmseviaa
241 qlpkilagmv kpllfhkk
```

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de progesterona es aminoácidos 14 a 261 de SEQ ID NO: 13. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 14 a 261 de SEQ ID NO: 13.

SEQ ID NO: 13 (Humano)

```
1 ftfspgqdiq lipplinllm siepdviyag hdntkpdts sltslnqlg erqllsvvkw
61 skslpgfrnl hiddqitliq yswmslmvfg lgwrsykhvs gqmlyfapdl ilneqrmkes
121 sfyscltmw qipqefvklq vsqeeflcmk vlllntipl eglrsqtqfe emrssyirel
181 ikaiglrqkg vvssqrlyq ltkldnlhd lvkqlhlycl ntfiqsralse vefpemmsev
241 iaalpkila gmvkpllfhk k
```

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de progesterona son los aminoácidos 679 a 926 de SEQ ID NO: 91. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 679 a 926 de SEQ ID NO: 91.

SEQ ID NO: 91 (Ratón)

```
1 mtelqakdpq vlhtsgasps pphigsplla rldsgpfqgs qhsdvssvvs pipisldgll
61 fprscrgpel pdgktgdqqs lsdvegafsg veathreggr nsrapekdsr ldsvidsll
121 tpsgteqsha sppaceaits wclfgpelpe dprsvpatkg llspmsrpe ikagdssgtg
181 agqkvlpkgl spprqllpt sgsahwpgag vkpsqpaaq eveedsglet egsaaplks
241 kpralegtgs gggvaanaas aapggvtlvp kedsrfsapr vsleqdspia pgrsplatv
301 vdfihvpilp inhallaart rqllegdsyd ggataqgpfa pprgspaps ppvpcgdfpd
361 ctyplegdpk edvfplygdf qtpglkikee eegadaavrs prpysagas sstfpdfpla
421 papqrapssr pgeaavagpp ssaavspass sgalecily kaegapptqg sfaplpckpp
481 aagscllprd slpaapataa apaiyqplgl nglpqlgyqa avlkdsipqv ypylnylrp
541 dseasqspqy gfdslpqkic licgdeasgc hygvltcgc kvffkrameg qhnylcagr
601 dcivdkirrk ncpacrlrk cqagmvlggr kfkfknkvr mrtldgvalp qsvglpnesq
661 algqrifsp nqeiqlvppl inllmsiepd vvyaghdntk pdtssllts lnqlgerqll
721 svvkwskslp gfrnlhiddq itliqyswms lmvfglgwrs ykhvsgqmly fapdlilneq
781 rmkelsfysl cltmwqipqe fvklqvthee flcmkvllll ntipleglrs qsqtfeemr
841 yirelikaig lrqkgvvpss qrlyqltkl dslhldvkql hlyclntfiq srlavefpe
901 mmseviaaql pkilagmvkp llfhkk
```

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión del ligando del receptor de progesterona son los aminoácidos 676 a 923 de SEQ ID NO: 92. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 676 a 923 de SEQ ID NO: 92.

SEQ ID NO: 92 (Rata)

1 mtelqakdpr tlhtsgaaps pthvgsplla rldpdpfqgs qhsdassvvs pipisldrll
 61 fsrcqagel pdektqnqqs lsdvegafsg veasrrsrn prapekdsrl ldsvidtlla
 121 psgpeqsqts ppaceaitsw clfgpelped prsvpatkgl lslmsrpes kagdssgtga
 181 gqkvlpkavs pprqlllpts gsahwpgagv kpsqqpatve veedgglete gsagpllksk
 5 241 pralegmcsq ggvtanappa apggvtlvpk edsrfasprv sleqdapvap grsplattv
 301 dfihvpilpl nhallaatr qllegdsydg gaaaqvfpap prgspaspsp pvpcgdfpdc
 361 typpegdpke dgfpvygef qpglkikiee egteaasrsp rpyllagasa atfpdfplpp
 421 rpprappsrp geaavaapsa avspvssgs alecilykae gapptqgsfa plpckppaas
 481 scllprdsip aaptssaapa iypplglnl pqlgyqaavl kdsipqvyp ylnylrpdse
 10 541 asqspqygfd slpqkiclic gdeasgchyg vltcgskvfk framegqhn ylcagrndci
 601 vdkirrkncp acrlrkccqa gmvlggrkfk kfnkvrvmra ldgvalpqs afpnesqtig
 661 qritfspnqe iqlvpplini lmsiepdvvy aghdntkpdtd sssltslnq lgerqllsvv
 721 kwskslpgrf nhiddqitl iqyswmslmv fglgwrsykh vsgqmlyfap dlilneqrnk
 781 elsfyslclt mwqipqefvk lqvtheeflc mkvlllnti pleglrsqsg feemrssyir
 15 841 elikaiglrq kgvvssqrf yqltklldl hdlvkqlhly clntfiqsra lavefpemms
 901 eviaaqlpki lagmvkpllf hkk

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión del ligando de receptor de progesteronason los aminoácidos 686 a 933 de SEQ ID NO: 93. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 686 a 933 de SEQ ID NO: 93.

25 SEQ ID NO: 93 (Babuino)

1 mtelkakgpr aphvaggpps pevgspllcr paagpfqgsq tsdtlpevsa ipisldglf
 61 prpcqgqdpl dektqdqsl sdvegaysra eatrgtgss srpekdsgl lhsvidtlla
 121 psgpgqsqps ppacevtssw clfgpelped ppaapatqgv lslmsrsgc kagdssgtga
 30 181 ahkvlprgls psrqllpas gsphwsgapv kpsqpqaave veeedgse esagpllk
 241 pralggaag ggaaavppga aaggvalvpk edsrfasprv alveqdapma pgrsplatt
 301 mdfthvpilp ishallaatr qlleesyd ggagaasafa pprsspsass tpvavgdfrp
 361 cayppdadpk ddayplygdf qppalkikiee eegaevsars prsylvagan paafpdfplg
 421 pppplpprap psrpgeaavt aapagasvss asssgstlec ilykaegapp qqgpfapppc
 35 481 kagaggcll prdglpsta saaaagaapa lypalgnl pqlgyqaavl keglqqvyp
 541 ylnylrpdse asqspqysfe slpqkiclic gdeasgchyg vltcgskvfk framegqhn
 601 ylcagrndci vdkirrkncp acrlrkccqa gmvlggrkfk kfnkvrvmra ldavalpqp
 661 gipnesqals qrtfppgqd iqlipplini lvsiepdvvy aghdntkpdtd sssltslnq
 721 lgerqllsvv kwskslpgrf nhiddqitl iqyswmslmv fglgwrsykh vsgqmlyfap
 40 781 dlilneqrnk essfyslclt mwqipqefvk lqvsqeeffc mkvlllnti pleglrsqtq
 841 feemrssyir elikaiglrq kgvvssqrf yqltklldl hdlvkqlhly clntfiqsra
 901 lsvefpemms eviaaqlpki lagmvkpllf hkk

En algunas formas de realización, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es o comprende un receptor de andrógenos. ligando dominio de unión, o un fragmento del mismo. Un ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de andrógenos humano son los aminoácidos 2 de 247 de SEQ ID NO: 14. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 2 a 247 de SEQ ID NO: 14.

SEQ ID NO: 14 (Humano)

1 piflnvleai epgvvcaghd nnqpdssaal lsslnelger qlvhvkvak alpgfrnlhv
 55 61 ddqmaviqys wmglmvfamg wrsftvnrs mlyfapdlvf neyrmhksrm ysqcvmrhl
 121 sqefgwqlqit pqeflcmkal llfsiipvdg lknqkffdel rmnyikeldr iackrknp
 181 scsrffyqit klldsvqpia relhqftfdl likshmvsvd fpemmaeiis vqvpkilsqg
 241 vkpiyftq

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de andrógenos son los aminoácidos 34 a 279 de SEQ ID NO: 15. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 34 a 279 de SEQ ID NO: 15.

SEQ ID NO: 15 (Humano)

1 sleegeasst tspteettqk ltvshiegye cqpiflnvle aiepgvvcag hdnnpdsfa
61 allsslnelg erqlvhvkw akalpgfrnl hvddqmaviq yswmglmvfa mgwrsftnvn
5 121 srmlyfapdl vfneyrmhks rmysqcvrmr hlsqefgwliq itpqeflcmk allfsiipv
181 dglknqkffd elrmnyikel driiackrkn ptscsrrfyq ltklidsvpq iarelhqftf
241 dllickshmvsv vdfpemmaei isvqvpkils gkvkpiyfht qeg

Otro ejemplo no limitativo del dominio de unión del ligando del receptor de andrógenos son los aminoácidos 19 a 264 de SEQ ID NO: 16. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando del receptor de hormonas es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 100 %, al menos 101 %, al menos 102 %, al menos 103 %, al menos 104 %, al menos 105 %, al menos 106 %, al menos 107 %, al menos 108 %, al menos 109 %, al menos 110 %, al menos 111 %, al menos %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticos a los aminoácidos 19 a 264 de SEQ ID NO: 16.

SEQ ID NO: 16 (Humano)

1 ettqklvtsh iegyecpif lnleiaiepg vvcaghdnnq pdsfaallss lnelgerqlv
61 hvvkwakalp gfrnlhvddq maviqyswmg lmvfmgwrs ftvnsmrly fapdlvfnv
121 rmhksrmysq cvrmrhlscq fgwlqitpqc flcmkallf siipvdglkn qkffdelrmn
181 yikeldria ckrknptscs rrfyqltkll dsvqpiarel hqftfdllik shmvsdvpfpe
25 241 mmaeiisvqv pkilsgkvkp iyfhtq

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de andrógenos son los aminoácidos 652 hasta 897 de SEQ ID NO: 94. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 652 a 897 de SEQ ID NO: 94.

SEQ ID NO: 94 (Ratón)

1 mevqlglgrv yprppsktyr gafqnlfsqv reaiqnpgpr hpeaaniapp gaciqqrqet
61 sprrrrrqqh tedgspqahi rgptgylale eeqpssqqqa aseghpessc lpepfaatap
121 gkglpqqppa pddqddsaap stslilgptf pglsscsadi kdilneagtm qlqqqqqqq
181 qhqqqhqqhq qqeqvisegs sarareatga pssskdsylg gntisidsak elckavsvsm
40 241 glgvealehl spgeqlrgdc myasllgppp avrptpcapl peckglplde gpgksteeta
301 eyssfkgya klegeslgc sgsseagssg tleipsssl yksgaldeaa ayqnrddyntf
361 plalsgpphp pppthphari klenpldygs awaaaaaqr ygdglshgg svagpstgsp
421 pattssswht lftaeegqly gpgggggss psdagvpapy gytrppqgl ssesdysase
481 wvypggvnr vpyppncvk semgpwmeny sgpygdmlrd strdhvlpid yyfppqktcl
45 541 icgdeasgch ygaltcgsc vfkraaegk qkylcasrnd ctidkfrkn cpscrlkcy
601 eagmtlgark lklgnlklq eegensnags ptedpsqkmt vshiegyecq piflnvleai
661 epgvvcaghd nnqpsdffaallsslnelger qlvhvkwak alpgfrnlhv ddqmaviqys
721 wmgmlmvfamg wrsftnvnsm rlyfapdlvf neyrmhksrm ysqcvrmrhl sqefgwliqit
781 pqeflcmkal lfsiipvdg lknqkffdel rmnyikeldr iackrknpt scsrrfyqit
50 841 klidsvpqia relhqftfdl lkshmvsvd fpemmaeiis vqvvpklsk vkpiyfhtq

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de andrógenos son los aminoácidos 655 a 900 de SEQ ID NO: 95. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 655 a 900 de SEQ ID NO: 95.

SEQ ID NO: 95 (rata)

1 mevqlglgrv yprppsktyr gafqnlfsqv reaiqnpgpr hpeaasiapp gaciqqrqet
61 sprrrrrqqh pedgspqahi rgttgyale eeqpssqqqs aseghpessc lpepfaatap
121 gkglpqqppa pddqddsaap stslilgptf pglsscsadi kdilseagtm qlqqqqqqq
181 qqqqqqqqq qqqqqevise gsssvreaa tgapssskds ylgnstisd sakelckavs
65 241 vsmglgveal ehlspeqlr gdcmyasllg gppavrptpc aplaeckglsl ldegpgkgt
301 etaeyssfkgy gylgleges lgcseseg ssgtleipss lslyksgavd eaaayqnrdy

361 ynfplalsgp phppppthph arikenpsd ygsawaaaaa qcrygdasl hggsvagpst
 421 gsppatasss whltftaeeg qlypgggggg ssspsdagpv apygytrppq glasqegdfs
 481 asevwypggv vnrpypspv cvksemgpwm enysgpygdm rldstrdhvl pidyyfppqk
 541 tlcicgdeas gchygaltcg sckvffkraa egkqkylcas rndctidkfr rkncpsclrl
 5 601 kcyeamgtlg arklklglgl klqeegenss agsptedpsq kmtvshiegy ecqipflnvl
 661 eaiepgvvca ghndnqpsd aallsslnel gerqlvhvvk wakalpgfrn lhvddqmavi
 721 qyswmglmvf amgwrsftnv nsrmlyfapd lvfneyrmhk srmysqcvrm rhlsqefgwl
 781 qitpqeflcm kallfsiip vdglnqkff delrmnyike ldriackrk nptscsrrfy
 841 qltklldsvq piarelhqft fdllikshmv svdfpemmae iisvqvpkil sgkvkpiyfh
 10 901 tq

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando del receptor de andrógenos es amino ácidos 648 a 893 de SEQ ID NO: 96. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 648 a 893 de SEQ ID NO: 96.

SEQ ID NO: 96 (Babuino)

1 mevqlglgrv yprppsktyr gafqnlfqsv reviqnpgpr hpeaasaapp gaslqqqqqq
 61 qqqsprqq qqqqgedgsp qahrrgptgy lvdeeqqps qpqsapechp ergcvpepga
 121 avaagkglpq qlpappdedd saapstlsil gptfpglssc sadlkdlse astmqllqqq
 181 qqeavsegss sgrareasga ptsskdnylg gtstidsak elckavsvsm glgvealehl
 25 241 spgeqlrgdc myapvlgvpp avrptcapl aeckgslldd sagkstedta eyspfkggyt
 301 klegeslgc sgaaaagssg tlelpslsl yksgaldea ayqsrddyfn plalagpppp
 361 pppphphari klenpldygs awaaaaaqcr ygelaslhga gaagpgsgsp saaaasswht
 421 lftaeegqly gpcggggggg ggggggagaa gavapygytr ppqglagqeg dftapdvwyw
 481 ggmvsvrpyy sptcvksemg pwmdsysgpy gdmrletard hvlpidyyfp pqtclicgd
 30 541 easgchylg tcsckvffk raaegkqkyl casrndctid kfrkncpsc rlrkcyeamg
 601 tlgarklkl gnlklqeege assttsptee taqkltvshi egyecqipfl nvleaiepgv
 661 vcaghdnnp dsfaallss nelgerqlvh vkwakalpg frnlhvddqm aviqyswmgl
 721 mvfamgwrsf tnvnsmlyf apdlvfneyr mhksrmysqc vmrhlsqef gwlqitpqef
 781 lcmkallfs iipvdglknq kfdelrmny ikeldriac krknptscsr rfyqltklld
 35 841 svqpiarelh qftfdllks hmvsvdfpemaieisvqvp kilskvkpi yfhtq

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es SEQ ID NO: 28. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

SEQ ID NO: 28 (Humano)

1 drrggmrlkh krqrddegr gevgsagdmr aanlwpsplm ikrskknsa lsitadqmvs
 61 alldaepiil yseydptrpf seasmglit nladrelvhm inwakrvpgf vdlthdqvh
 121 lleawleil miglvwrsme hpgklfapn llldrngkvc vegmveifdm llatssrfm
 181 mnlqgeefvc lksiillnsg vyfllstlk sleekdhhr vldkitdtli hlmakagtl
 241 qqhqrlaq lllshirhm snkrmehlly mkcknvvplf dllemldah rlhapt

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión a ligando es SEQ ID NO: 29. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

SEQ ID NO: 29 (Humano)

1 gqdqiippl inllmsiepd viyaghdntk pdtssllts lnqlgerqll svvkwskslp
 61 gfrnlhiddq itliqyswms lmvfglwrs ykhvsgqmly fapdlilneq rmkessfysl
 121 cltmwqipqe fvklysqee flcmkvlll ntiplelrs qtqfeemrss yirelikaig
 181 lrqkgvvss qrfyqltkll dnldhvlkql hlyclntfiq sralsvefpe mmseviaaq
 241 pkilagmvkp llfhkk

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor de ecdisona

Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor de ecdisona pueden ser los aminoácidos 256 a 467 de SEQ ID NO: 74. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 256 a 467 de SEQ ID NO: 74.

SEQ ID NO: 74 (Humano)

1 merdepppsg ggggggsagf leppaalppp prngfcqdel aeldpgtisv sddraeqrtc
61 licgdratgl hygiiscegc kgffkrsicn krvyrcsrdk ncvmsrkqrn rcqycrllkc
121 lqmgmnrkai redgmpggrn ksigpvqise eeierimsgq efeeianhws nhgdsdhssp
181 gnrasenqp spgstlsssr svelngfmaf reqymgmsvp phyqyiphlf sysghspllp
241 qqarsldpqs yslihqllsa edleplgtm liedgyavtq aelfallcl adellfrqia
301 wikkpffce lsikdytcll sstwqelill ssitvyskqi fgeladvak yspdeelh
361 fsdegmevie rliylhkhfh qlkvsneeya cmkainflnq dirgltsasq leqlnkrywy
421 icqdfteyky thqpnrfpdl mmclpeiryi agkmvnpvle qlpllfkvvl hsccktsvgke

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor PPAR γ . Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor PPAR γ pueden ser los aminoácidos 237 a 504 de SEQ ID NO: 75. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 237 a 504 de SEQ ID NO: 75.

SEQ ID NO: 75 (Humano)

1 mgetldgsi dpesdsftdt lsanisqemt mvdtempfwf tngissvdl svmedhshsf
61 dikpftvdf ssistphyed ipftrdpvv adykydlklq eyqsaikvpe asppyysekt
121 glynkpheep snslmaiecr vcgdkasgfh ygvhacegck gffrtirkl liydrdlnlnc
181 rihkksrnc qycrfqkcla vgmshnairf grmpqaekek llaeissdid qlnpesadlr
241 alakhlydsy iksfpltkak arailtgkt dkspfiydm nslmmedgi kfkhitplqe
301 qskevairif qgcqfrsvea vqeyeyaks ipgfvnldln dqvtllkygv heiiytmlas
361 lmnkdglvis egqgfmrtf lkslrkpfqd fmepekfevaf kfnaledldd dlaifavi
421 lsgdrpglln vkpiediqdn llqalelqlk lnhpessqlf akllqkmtld qivtehvql
481 lqviktetd mslhpllei ykdly

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor de glucocorticoides. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor de glucocorticoides pueden ser los aminoácidos 531 a 777 de SEQ ID NO: 76. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 531 a 777 de SEQ ID NO: 76.

SEQ ID NO: 76 (Humano)

1 mdskesltpg reenpssvla qergdvmdfy ktlrggatvk vsasspslav asqsdskqrr
61 llvdfpkgsv snaqqpdlk avslsmglym getetkvmgn dlqfpqqqi slssgetdlk
121 lleesianln rstsvpenpk ssastavsaa ptekefpkth sdvsseqhl kgqgtnggn
181 vklyttqst fdilqdlfcs sgspgketne spwrslldid enclslplag eddsfllegn
241 snedckplil pdtkpkikdn gdlvlsspsn vtlpqvktek edfielctpg es:vikqeklgv
301 ycqasfpgan iignkmsais vhgvtsggq myhydmtas lsqqdqkpi fnvipipvg
361 senwnrcqgs gddnltslgt lnfpgrtvs ngyspsmrp dvssppssss tattgpppkl
421 clvcsdeasg chgyvlctgs ckvffkrave gqhnlycagr ndciidkrr kncpacryrk
481 clqagmlea rtkkkikgi qqattgvsqe tsepnngkti vpatlpqltp tlvslevie
541 pevlyagyds svpdstwrin tlnmlggrq viaavkwaka ipgfrnlhd dqmtllqysv
601 mflmafalgw rsyrssanl lcfapdliin eqrmtlpcmy dqckhmlyvs selhrlqvsv
661 eeylcmktil 11s svpkdgl ksqelfdeir mtyikelgka ivkregnsq nwqrlyqltk
721 lldsmhevve nlnyfcqtf ldktmisiefp emlaeiitng ipkysngnik klhfqk

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor de hormona tiroidea. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor de glucocorticoides pueden ser los aminoácidos 162 a 370 de SEQ ID NO: 77. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos

85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 162 a 370 de SEQ ID NO: 77.

5 SEQ ID NO: 77 (Humano)

1 meqkpskvec gsdpeensar spdgrkrkn gqcslktsms gyipsyldkd eqcvvcgdka
61 tgyhyrcitc egckgffrt iqknlhptys ckydscovid kitrnqcqlc rfkkiavgm
121 amdlvddsk rvakrklieq nrerrkeem irslqqrpep tpeewdlihi ateahrstna
10 181 qgshwkqrrk flpddigqsp ivsmpdgdkv dleafseftk iitpairvv dfakklpmfs
241 elpcedqil lkgccmeims lraavrydpe sdtitlsgem avkreqlkng glgvvsdaif
301 elgkslsafn lddtevallq avllmstdrs gllcvdkiek sqeayllafe hyvnhrkhi
361 phfwpkllmk erevqssily kgaaaegrpg gslgvhpegq qlgmhvvqg pqvrqleqq
421 geagslqgpv lqhqspskp qrllellhrs gilharavcg eddsseadsp ssseepevc
15 481 edlagnaasp

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor de mineralocorticoides. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor de mineralocorticoides pueden ser los aminoácidos 737 a 984 de SEQ ID NO: 78. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 737 a 984 de SEQ ID NO: 78.

25 SEQ ID NO: 78 (Humano)

1 metkgyhslp egldmerrwg qvsqaverss lgptertden nymeivnvc vsgaipnnst
61 qgsskekqel lpcldqnnr pglitsdikt eleskelsat vaesmglymd svrdadysye
121 qqnqqgsm sp akiyqnveql vkfykgnghr pstlscvntp lrsfmsdsgs svnggvmai
30 181 vkspimchek spsvcsplnm tssvcspagi nsvsstasf gsfpvhspit qgtpltcspn
241 aenrgsrshs pahasnvgsp lssplssmks sissppshcs vkspvsspnn vtlrsvssp
301 aninnsrscv sspstnnrs tlsspaastv gsicspvna fsytasgtsa gsstlrdivp
361 spdtqekgaq evpfpkteev esaisngvtg qlnivqyikp epdgafsssc lggnskinsd
421 ssfsvpikqe stkhscsgts fkgntvnpf pfmdgsyfsf mddkdyyss gilgppvpgf
35 481 dgncegsfpg vgikqepddg syypeasips saivgvnsgg qsfhyrigaq gtislsrsar
541 dqsqhlssf ppvntlvsw kshgdlsrr sdgypvleyi penvssstlr svstgssrps
601 kiclvcdga sgchgyvvtc gscckvffkra vegqhnylca grndciidki rrkncpacrl
661 qkclqagmnl garkskklgk lkgiheeqpq qqpppppppp pqspeegtty iapakepsvn
721 talvpqlsti sraltspvm vleniepeiv yagydsdkpd taenllstin rlagkmiqv
40 781 vkwakvlpfg knlpledqit liqyswrncls sfalswrsyk htmsqflyfa pdlvneekm
841 hqsamyelcq gmhqlslqfv rqltfeeyt imkvlllst ipkdglksqa afeemrnyi
901 kelrkmtkc pnnsqswqr fyqltklds mhdvlsdle fcytfresh alkvefpam
961 veiisdqlpk vesgnakply fhrk

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor de vitamina D. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor de vitamina D pueden ser los aminoácidos 124 a 426 de SEQ ID NO: 79. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 124 a 426 de SEQ ID NO: 79.

SEQ ID NO: 79 (Humano)

1 meamaastsl pdpgdfdrnv pricgvcdgdr atgfhnamt cegckgffr smkrkalftc
61 pfngdcritk dnrrhcqacr lkrcvdigmm kefilteev qrkremilkr keeealkdsl
121 rplkseeqqr iiailldaih ktydptysdf cqrppvrnv dgggshpsrp nsrhtpsfg
181 dssscsdhc itssdmmdss sfsnldsee dsddpsvtle lsqslmplh adlvysiqk
241 vigfakmipg frdltsedqi vllksaiev imlrsnesft mddmswtcgn qdykyrvsdv
301 tkaghsllei eplikfqvg kklnlheeh vllmaicivs pdrpgvqdaa lieaiqrlls
361 nltqyirrc hpppgshlly akmiqkladl rslnheehsq yrclsfqpec smkltpvlle
421 vfneis

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor PPARa. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor PPARa pueden ser los aminoácidos 201 a 467 de SEQ ID NO: 80. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una

secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 201 a 467 de SEQ ID NO: 80.

5

SEQ ID NO: 80 (Humano)

1 mvdtesplcp lspleagdle splseeflqe mgniqueisqs igedssgsfg fteyqylgsc
61 pgsdgsvidt tlpaspss vtypvpgsv despsgalni ecricgdkas gyhygvhace
10 121 gckgffrti rklvydkcd rskiqkknr nkcqycrfhk clsvgmshna irfgmrprse
181 kaklkaeilt cehdiedset adklslakri yeaylknfnm nkvtarvils gkasnppfv
241 ihdmetlcma ektlvaklva ngiqnkeaev rihccqcts vetvteltef akaipgfanl
301 dlndqvtilk ygvyaeifam lssvmnkdgm lvayngngfit reflkslrkp fcdimepkfd
361 famkfnael ddsdislfva aiiccgdrpg llnvgheikm qegivhlrl hlqsnhpddi
15 421 flfpklqkm adrlqlvteh aqlvqiikt esdaalhpil qeiyrdmy

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor PPAR β/δ . Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor PPAR β/δ pueden ser los aminoácidos 173 a 440 de SEQ ID NO: 81. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una
20 secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 173 a 440 de SEQ ID NO: 81.

25 SEQ ID NO: 81 (Humano)

1 meqpqeeape vreeeekeev aeaegapeln ggpqhalpss sytdlsrsss ppslldqlqm
61 gcdgascgsl nmeercvcgdk asgfhygvha cegckgffrr tirmkleyek cersckiqkk
121 nrnkcyqcrf qkclalgmsh nairfgrmpe aekrkvlagl tanegsqynp qvadlkafsk
30 181 hiynaylknf nmtkkkarsi ltgkashtap fvihdietlw qaeqglvwkq lvnglpypyke
241 isvhvfyrqy cttvetvrel tefaksipsf sslfndqvt llkygvheai famlasivnk
301 dgllvangsg fvtreflrsi rkpfsdiiep kfefavkfna leddsdial fiaaiicgd
361 rpglmnvprv eaiqdtlira lefhlqanhp daqylfpkl qkmadrqlv tehaqmmqri
421 kktetetslh pllqeyikdm y

35

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor de pregnano X. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor de pregnano X puede ser los aminoácidos 143 a 428 de SEQ ID NO: 82. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 143 a 428 de SEQ ID NO: 82.

40

SEQ ID NO: 82 (Humano)

45

1 mevrpkswn hadfvhcedt esvpgkpsvn adeevggpqi crvcgdkatg yhfvmvmtceg
61 ckgfframk rnarlcprf kgaceitrkt rrcqacrlr kclesgmkke mimsdeavee
121 rralikrks ertgtplgv qglteeqrm m irelmdaqmk tfdttfshfk nfrlpgvlss
181 gcelpeslqa psreeaakws qvrkdclsk vsllrgedg svwnykppad sggkeifsl
50 241 phmadmstym fkgiisfakv isyfrdlpie dqlsilkgaa felcqlrfnt vfnaetgtwe
301 cgrlsycked taggfqlll epmlkfhyml kklqlheeey vlmqaislfs pdrpgvlqhr
361 vvdqlqeqfa itlksyiecn rqpahrlf lkimamltel rsinaqhtqr llriqdihp
421 atplmqelfg itgs

Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor X del hígado. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor X del hígado puede ser los aminoácidos 20 a 255 de SEQ ID NO: 83. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 20 a 255 de SEQ ID NO: 83.

60

SEQ ID NO: 83 (Humano)

65 1 gshmsqgsge gegvqltaaq elmiqqlvaa qlqcnkrsfs dqpkvtpwpl gadpqsrdar
61 qqrfahtel aiisvqeivd fakvpgflq lgredqiall kastieimll etarrynhet

121 ecitflkdft yskddfhfrag lqvefinpif efsramrrlg lddaeyalli ainifsadrp
 181 nvqepgrvea lqqpyveall sytrikrpqd qlrfrprlmk lvsrltssv hseqvfairl
 241 qdkklppls eiwdvhe

- 5 Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor farnesoide X. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor farnesoide X pueden ser los aminoácidos 247 a 467 de SEQ ID NO: 84. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 247 a 467 de SEQ ID NO: 84.

SEQ ID NO: 84 (Humano)

- 15 1 mgskmnlieh shlpdtdfsg fsenlfgyit eqvagplgqn lelepysqys nvqfpqvqpq
 61 issssysnll gfypqqpeew yspgiyelrr mpaetlyqge tevaempvtk kprmgasagr
 121 ikgdelcvcv gdrasgyhyn altcegckgf frsritknay ycknngncv mdmymrrkcq
 181 eclrlckem gmlaelclte iqckskrlrk nvkqhadqtv nedsegrdlr qvtsttkscr
 241 ekteltpdqg tlhfmdsy nkqrmpeit nkilkeefa eenfiltem atnhvqvive
 20 301 ftkklpgqft ldhedqiall kgsaveamfl rsaeifnkl psghsdlee rirngisde
 361 yitpmfsfyk sigelkmtqe eyalltaivi lspdrqykld reaveklqep lldvqlckick
 421 ihqpenpqhf acllgrtel rtfnnhhaem lmswrvndhk ftplceiwd vq

- 25 Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor huérfano A relacionado con RAR. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor huérfano A relacionado con RAR puede ser los aminoácidos 217 a 456 de SEQ ID NO: 85. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 217 a 456 de SEQ ID NO: 85.

SEQ ID NO: 85 (Humano)

- 35 1 mmyfviaamk aqieipcki cgdksqsihy gvitcegckg ffrsqqsna tyscpqrknc
 61 lidrtsnrc qhcrqlqcla vgmsrdavkf grmskkqrdv lyaevqkhrm qqqqrhdhqq
 121 pgeaepitpt ynisangtle lhddlsnyid ghtpegskad savssfyldi qspdqsgld
 181 ingikpepic dytpasgffp ycsftngets ptvsmaeleh laqniskshl etcqylreel
 241 qqitwqtlfq eeienyqnkq revmwqlcai kiteaiqvyy efakridgfm elcqnqdvil
 301 lkagslevvf irmcrafsdq nntvyfdgky aspdvfksg cedfisvfe fgkslcsmhil
 40 361 tedeialfsa fvmsadrsrw lqekvkiekl qqkiqlalqh vlqknhredg iltklickvs
 421 tlralcgrht eklmafkaiky pdivrlhfpf lykelftsef epamqidg

- 45 Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor huérfano C relacionado con RAR. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando de un receptor huérfano C relacionado con RAR puede ser los aminoácidos 268 a 506 de SEQ ID NO: 86. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 268 a 506 de SEQ ID NO: 86.

SEQ ID NO: 86 (Humano)

- 55 1 mdrapqrqhr asrellaakk thtsqievip ckicgdkssg ihgyvitceg ckgffrsqr
 61 cnaaysctrq qncpidtrsr nrcqhcrqlq clalgmsrda vkfgrmskkq rdsilhaevqk
 121 qlqqrqqqqq epvvktppag aqgadtlityt lglpdgqlpl gsspdipeas acppgllkas
 181 gsgpsysnll akaglngasc hleyspergk aegresfyst qsqtpdrcg lrfcehrhpg
 241 lgelgqgpps ygspfsrstp eapysaltei ehvqsvcks yretcqlrle dlrlqrsnif
 301 sreevtgyqr ksmwemwerw ahhlteaiqy vvefakrlsg fmelcqnqdi vlkagamev
 361 vlvrncrayn adnrtvffeg kyggmelfra lgcselissi fdfshslsal hfsedeialy
 60 421 talvlinahr pglqekrkve qlqynlelaf hhhclckthrq silaklppkg krlslcsqhv
 481 erlqifqhlh pivvqaafpp lykelfstet espvglsk

- 65 Otro ejemplo no limitante de un dominio de unión de ligando es un dominio de unión de ligando de un receptor de ácido retinoico. Por ejemplo, un dominio de unión de ligando del receptor de ácido retinoico pueden ser los aminoácidos 156 a 385 de SEQ ID NO: 87. En algunas formas de realización, un dominio de unión de ligando de receptor de hormona es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos

85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los aminoácidos 156 a 385 de SEQ ID NO: 87.

5 SEQ ID NO: 87 (Humano)

1 mlgglspgga ltlqhqplpv sgystpspat ietqsssee ivpsppspvp lpriykpfcv
61 cqdksqgyhy gvsacegvkg ffrsiqknm vytvhrdknc iinkvtrnc qycrlqkcf
121 vgmskesvrn drnkkkkev kpcsesyvt tpevgeliek vrkahqetfp alcqlgkytt
10 181 nnsseqrsl didlwdkfse lskciikt vefakqlpgft ttiadtqitl lkaacdili
241 lrictrype qdmtfsdgl tlnrtqmhn gfgpltdlvf afanqlple mddaetglls
301 aiclicgdrq dleqpdrvm lqepllealk vyvrkrpsr hmfpmklmki tdlrsisakg
361 aervitkme ipgsmplliq emlensegld tlgqpgggg rdggglapp gscspslsp
421 snrspaths p

15 Como se puede apreciar en la técnica, los aminoácidos que no se conservan entre diferentes homólogos mamíferos de los dominios de unión del ligando del receptor de hormonas tienen más probabilidades de no desempeñar un papel importante en la actividad de unión de la hormona o del análogo de la hormona del dominio de unión del ligando, mientras que los aminoácidos que se conservan entre diferentes homólogos mamíferos de los dominios de unión del ligando del receptor de hormonas tienen más probabilidades de desempeñar un papel importante en la actividad de unión de la hormona o del análogo de la hormona del dominio de unión del ligando. Algunos dominios de unión de ligando pueden incluir una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) sustituciones de aminoácidos que no se conservan entre diferentes homólogos mamíferos de los dominios de unión de ligando del receptor de hormonas.

25 Dominios de unión a antígeno

En algunas formas de realización de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única o los receptores de antígeno quiméricos de cadena múltiple, el dominio de unión a antígeno se puede seleccionar entre un scFv, un scFv-Fc, un dominio V_HH, un dominio V_{NAR}, un (scFv)₂ y un BiTE. Ejemplos adicionales de dominios de unión a antígeno que se pueden utilizar en un receptor de antígeno quimérico de cadena única o en un receptor de antígeno quimérico de cadena múltiple.

Un fragmento Fv o scFv de cadena única incluye un dominio V_H y un dominio V_L en una sola cadena polipeptídica. El V_H y el V_L generalmente están unidos por un enlace peptídico. En otros ejemplos, el enlazador puede ser un solo aminoácido. En algunos ejemplos, el conector puede ser un enlace químico. Véase, por ejemplo, Pluckthun, *Antibodies from E. coli*. En Rosenberg M. & Moore G.P. (Eds.), *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, págs. 269-315, Springer-Verlag, Nueva York, 1994. Se muestran secuencias V_L y V_H ejemplares que se pueden utilizar en un scFv en las SEQ ID NO: 104 y 108 en los Ejemplos. Un enlazador ejemplar que se puede utilizar entre los dominios V_L y V_H en un scFv puede ser cualquiera de los enlazadores ejemplares descritos en este documento (por ejemplo, un enlazador que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 106).

40 Los fragmentos sc-Fv-Fc incluyen un scFv unido a un dominio Fc. Por ejemplo, un dominio Fc se puede unir, por ejemplo, al extremo C del scFv. El dominio Fc puede seguir al V_L o V_H, dependiendo de la orientación de los dominios variables en el scFv. El dominio Fc puede ser cualquier dominio Fc conocido en la técnica. En algunos ejemplos, el dominio Fc es un dominio Fc IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (por ejemplo, un dominio Fc IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano).

45 Los BiTE son dominios de unión a antígenos que incluyen dos V_L y dos V_H en un solo polipéptido que juntos forman dos scFv, que pueden unirse cada uno a diferentes epítomos en el mismo antígeno o cada uno a diferentes antígenos. Véase, por ejemplo, Baeuerle et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11:22-30, 2009; Wolf y col., *Drug Discovery Today* 10:1237-1244, 2005; y Huehls y col., *Immunol. Cell Biol.* 93:290-296, 2015.

50 Un dominio V_HH es un dominio de anticuerpo variable monomérico único que se encuentra en los camélidos, y un dominio V_{NAR} es un dominio de anticuerpo variable monomérico único que se encuentra en los peces cartilaginosos. Los dominios V_HH y los dominios V_{NAR} se describen, por ejemplo, en Van Audenhove et al., *EBioMedicine* 8:40-48, 2016; Krah et al., *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 38:21-28, 2016; Cromie et al., *Curr. Top. Med. Chem.* 15:2543-2557, 2016; Kijanka et al., *Nanomedicine* 10:161-174, 2015; Kovaleva et al., *Expert. Opin. Biol. Ther.* 14:1527-1539, 2014; De Meyer et al., *Trends Biotechnol.* 32:263-270, 2014; Mujic-Delic et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 35:247-255, 2014; Muyldermans, *Ann. Rev. Biochem.* 82:775-797, 2013; Vincke et al., *Methods Mol. Biol.* 911:15-26, 2012; Rahbarizadeh et al., *Immunol. Invest.* 40:299-338, 2011; Van Bockstaele y col., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:1212-1224, 2009; Wesolowski y col., *Med. Microbiol. Immunol.* 198:157-174, 2009; De Genst y col., *Dev. Comp Immunol* 30:187-198, 2006; Muyldermans, *J Biotechnol.* 74:277-302, 2001; y Muyldermans et al., *Trends Biochem. Sci.* 26:230-235, 2001.

65 En algunas formas de realización de los receptores de antígeno quiméricos multicadena, al menos dos de los polipéptidos que componen el receptor de antígeno quimérico multicadena pueden interactuar entre sí para formar un dominio de unión a antígeno. En tales formas de realización, el dominio de unión a antígeno se puede seleccionar del grupo de un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un anticuerpo de redireccionamiento de afinidad dual (DART), Fab-scFv-Fc, un triomab, un crossmab, un orto-Fab IgG, IgG-scFv, scFv2-Fc, un bi-nanocuerpo, anticuerpo tandem, un DART-Fc,

un scFv-HAS scFv, DNL-Fab3, DAF (dos en uno o cuatro en uno), DutaMab, DT-IgG, LC común de protuberancias en agujeros, ensamblaje de protuberancias en agujeros, anticuerpo de intercambio de brazo Fab, SEEDcuerpo, Triomab, LUZ-Y, scDiacuerpo-Fc, Fcab, k11-cuerpo, Fab ortogonal, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)-IgG, IgG (L,H)-Fc, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zycuerpo, DVI-IgG, nanocuerpo, nanocuerpo-HSA, un diacuerpo, un TandAb, scDiacuerpo, scDiacuerpo-CH3, anticuerpo de par de carga, diacuerpo-CH3, Cov-X-Bod, Triple Cuerpo, minianticuerpo, un DVD-Ig, minicuerpo, un minicuerpo TriBi 2 en 1-IgG, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂-scFv2, scFv-KIH, HCAB tetravalente, diacuerpo-Fc, scFv-Fc en tándem, intracuerpo, anticuerpo biespecífico de acoplamiento y bloqueo, ImmTAC, HSAcuerpo, scDiacuerpo-HAS, scFv en tándem, IgG-IgG y scFv1-PEG-scFv2

Los ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno incluyen un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fab'. Ejemplos adicionales de un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno son un fragmento de unión a antígeno de una IgG (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno de una IgG humana o humanizada, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana o humanizada); un fragmento de unión a antígeno de una IgA (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno de IgA1 o IgA2) (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno de una IgA humana o humanizada, por ejemplo, una IgA1 o IgA2 humana o humanizada); un fragmento de unión a antígeno de una IgD (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno de una IgD humana o humanizada); un fragmento de unión a antígeno de una IgE (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno de una IgE humana o humanizada); o un fragmento de unión al antígeno de una IgM (por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno de una IgM humana o humanizada)

Se describen ejemplos de DVD-Igs, por ejemplo, en DiGiammarino et al., *Methods Mol Biology* 899:145-156, 2012; Jakob et al., *MABs* 5:358-363, 2013; y EE. UU. Números de patente 7.612.181; 8.258.268; 8.586.714; 8.716.450; 8.722.855; 8.735.546; y 8.822.645 Se describen ejemplos de DART en, por ejemplo, Garber, *Nature Reviews Drug Discovery* 13:799-801, 2014. Se describen ejemplos de triomabs, kih IgG con LC comunes, crossmabs, orto-Fab IgG, 2-en-1-IgG, IgG-ScFv, scFv2-Fc, bi-nanocuerpos, anticuerpos en tándem, DART-Fc, scFv-HAS-scFv y DNL-Fab3 en, por ejemplo, Kontermann et al., *Drug Discovery Today* 20:838-847, 2015. Ejemplos de DAF (dos en uno o cuatro en uno), DutaMabs, DT-IgG, LC comunes con perillas en agujeros, ensamblajes con perillas en agujeros, anticuerpos de pares de carga, anticuerpos de intercambio de brazos Fab, SEEDbodies, Triomabs, LUZ-Ys, Fcabs, k11,-bodies, Fabs ortogonales, DVD-IgGs, IgG(H)-scFvs, scFv-(H)IgGs, IgG(L) scFvs, scFv-(L)-IgGs, IgG (L,H)-Fc, IgG(H)-Vs, V(H)-IgGs, IgG(L)-Vs, V(L)-IgGs, KIH IgG-scFabs, 2scFv-IgGs, IgG-2scFvs, scFv4-Igs, Zybodies, DVI-IgGs, nanocuerpos, nanocuerpo-HSAs, diabodies, TandAbs, scDiabodies, scDiacuerpo-CH3s, Diacuerpo-CH3s, Cuerpos Triples, minianticuerpos, minicuerpos, minicuerpos TriBi, scFv-CH3 KIHS, Fab scFvs, scFv-CH-CL-scFvs, F(ab')₂-scFv2s, scFv-KIHS, Fab-scFv-Fcs, HCAbs tetravalentes, scDiacuerpo-Fcs, diacuerpo-Fcs, scFv-Fcs en tándem, intracuerpos, anticuerpos biespecíficos de acoplamiento y bloqueo, ImmTACs, HSAbodies, scDiacuerpo-HASs, scFvs en tándem, IgG- IgGs, Cov-X-Bodies y Los scFv1-PEG-scFv2 se describen, por ejemplo, en Spiess et al., *Mal Immunol* 67:95-106, 2015.

Cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en este documento puede unirse a un antígeno con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de menos de 1×10^{-7} M, menos de 1×10^{-8} M, menos de 1×10^{-9} M, menos de 1×10^{-10} M, menos de 1×10^{-11} M, menos de 1×10^{-12} M o menos de 1×10^{-13} M. En algunas formas de realización, los complejos de proteínas de unión a antígenos descritos en este documento pueden unirse a un primer y/o segundo antígeno con una K_D de aproximadamente 1×10^{-4} M a aproximadamente 1×10^{-6} M, aproximadamente 1×10^{-5} M a aproximadamente 1×10^{-7} M, aproximadamente 1×10^{-6} M a aproximadamente 1×10^{-8} M, aproximadamente 1×10^{-7} M a aproximadamente 1×10^{-9} M, aproximadamente 1×10^{-8} M a aproximadamente 1×10^{-10} M, o aproximadamente 1×10^{-9} M a aproximadamente 1×10^{-11} M (inclusive). Se puede utilizar una variedad de métodos diferentes conocidos en la técnica para determinar el valor K_D de un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un ensayo de cambio de movilidad electroforética, un ensayo de unión a filtro, resonancia de plasmón superficial y un ensayo de cinética de unión biomolecular, etc.)

Antígenos

En algunas formas de realización, un dominio de unión a antígeno descrito en este documento puede unirse a un solo antígeno (por ejemplo, cualquiera de los antígenos ejemplares descritos en este documento o conocidos en la técnica). En algunas formas de realización, un dominio de unión a antígeno descrito en este documento puede unirse a dos o más antígenos diferentes (por ejemplo, dos o más de cualquiera de los antígenos ejemplares descritos en este documento o conocidos en la técnica). Los ejemplos no limitantes de antígenos incluyen: HER2, antígeno A33, 9-0-acetil-GD3, marcador CA19-9, BhCG, marcador CA-125, carboanhidrasa IX (MN/CA IX), calreticulina, CCR5, CCR8, CD2, CD3, CD5, CD16, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD36, CD40L, CD44, CD44V6, CD63, CD70, CD84, CD96, CD100, CC123, CD133, CD137, CD138, CD150, CD152 (CTLA-4), CD160, CRTAM, CS1 (CD319), DNAM-1 (CD226), CD229, CD244, CD272 (BTLA), CD274 (PD1-1, B7HI), CD279 (PD-1), CD319, CD352, CRTAM (CD355), CD358, DR3, GTR (TNFRSF 18), HVEM, ICOS, LIGHT, LTBR, OX40, formas activadoras de KIR, NKG2C, NKG2D, NKG2E, uno o más receptores de citotoxicidad natural, NTB-A, PEN-5, antígeno embrionario de carcinoma (CEA; CD66e), desmogleína 4, neoepítipo de E-cadherina, endosialina, efrina A2 (EphA2), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), fucosil GM1, GD2, GD3, GM2, gangliósido GM3, Globo H, glicoproteína 100, HER2/neu, HER3, HER4, receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina, Lewis-Y, LG, Ly-6, proteoglicano de sulfato de condroitina específico del melanoma (MCSCP), mesotelina, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4,

MUC5AC, MUC5b, MUC7, MUC16, receptor de sustancia inhibidora de Müller (MIS) tipo II, antígeno de células plasmáticas, poli SA, PSCA, PSMA, Sonic Hedgehog (SHH), SAS, STEAP, antígeno sTn, precursor de TNF- α , 2B4 (CD244), 2-integrinas, KIR, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL2, KIR-L, KLRG1, LAIR-1, NKG2A, NKR-P1A, Siglec-3, Siglec-7, Siglec-9, TCR α , TCR β , TCR γ , TIM1, LAG3, LAIR1, PD-1H, TIGIT, TIM2 y TIM3. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de antígenos.

Dominios coestimuladores

En los linfocitos normales, la activación de las células T está mediada por dos clases de dominios de señalización intracelular. La señalización primaria se inicia a través de la activación dependiente de antígeno mediada por MHC a través del receptor de células T (por ejemplo, un complejo TCR/CD3). Una señal secundaria o coestimuladora es revelada por un receptor diferente que incluye un dominio de señalización coestimuladora, que actúa de manera independiente del antígeno. Las señales generadas a través del dominio de señalización del TCR por sí solas son insuficientes para la activación completa de las células T; también se requiere una señal coestimuladora.

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio coestimulador, o una porción del mismo, de un polipéptido transmembrana endógeno de mamífero (por ejemplo, humano) seleccionado del grupo de: CD27 (también conocido como S152, S152.LPFS2, T14, TNFRSF7 y Tp55), CD28 (también conocido como Tp44), 4-1BB (también conocido como TNFRSF9, CD137, CDw137, ILA y miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 9), OX40 (también conocido como TNFRSF4, ACT35, RP5-902P8.3, IMD16, CD134, TXGPIL y miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 4), CD30 (también conocido como TNFRSF8, D1S166E y Ki-1), CD40L (también conocido como CD40LG, CD154, HIGM1, IGM, IMD3, T-BAM, TNFSF5, TRAP, gp39, hCD40L y ligando CD40), CD40 (también conocido como Bp50, CDW40, TNFRSF5, p50, CD40 (proteína) y molécula CD40), PD-1 (también conocido como PDCD1, CD279, PD-1, SLEB2, hPD-1, hPD-1, hSLE1 y muerte celular programada 1), PD-L1 (también conocido como CD274, B7-H, B7H1, PD-L1, PDCD1L, PDCD1LG1, PDL1, molécula CD274 y ligando 1 de muerte celular programada 1), ICOS (también conocido como AILIM, CD278 y CVIDI), LFA-1 (también conocido como antígeno 1 asociado a la función linfocítica), CD2 (también conocido como LFA-2, SRBC, T11 y molécula CD2), CD7 (también conocido como GP40, LEU-9, TP41, Tp40 y molécula CD7), CD160 (también conocido como molécula BY55, NK1, NK28 y CD160), LIGHT (también conocido como TNFSF14, CD258, HVEM, LIGHT, LT α , TR2, TNLGID y miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral), BTLA (también conocido como CD272 y BTLA1), TIM3 (también conocido como HAVCR2, HAVcr-2, KIM-3, TIM3, TIMD-3, TIMD3, Tim-3, CD366 y receptor celular 2 del virus de la hepatitis A), CD244 (también conocido como 2B4, NAIL, NKR2B4, Nmrk, SLAMF4 y molécula CD244), CD80 (también conocido como B7, B7-1, B7.1, BBI, CD28LG, CD28LG1, LAB7 y molécula CD80), LAG3 (también conocido como CD223 y activador de linfocitos 3), NKG2C (también conocido como CD314, D12S2489E, KLR, NKG2-D, NKG2D y receptor similar a lectina de células asesinas KI), GITR (también conocido como TNFRSF18, RP5-902P8.2, AITR, CD357 y GITR-D), HVEM (también conocido como TNFRSF14, RP3-395M20.6, ATAR, CD270, HVEA, HVEM, LIGHTR y TR2), TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD54 (ICAM), CD83, DAPIO, LAT, SLP76, TRIM, ZAP70 y B7-H3 (también conocida como molécula CD276, 4Ig-B7-H3, B7H3, B7RP-2 y CD276). Las letras "CD" en la oración anterior significan "grupo de diferenciación". Por ejemplo, CD3 significa "grupo de diferenciación 3". En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio coestimulador, o una porción del mismo, de un polipéptido transmembrana endógeno de mamífero (por ejemplo, humano) (por ejemplo, un homólogo de mamífero o humano de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente).

Cualquier dominio coestimulador, o porción del mismo, que sirva para proporcionar una señal coestimuladora es adecuado para su uso de acuerdo con las composiciones y métodos descritos en este documento. En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio coestimulador, o una porción del mismo, de CD28 humano (por ejemplo, n° de adhesión P01747, p. ej., de los aminoácidos 180 a 220 de SEQ ID NO: 18). En algunas formas de realización, un dominio coestimulador es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica (o es idéntica) a los aminoácidos 180 a 220 de SEQ ID NO: 18, o un fragmento de la misma. En algunas formas de realización, un dominio coestimulador es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % (o es idéntica) a SEQ ID NO: 116, o un fragmento de la misma.

SEQ ID NO: 18

```
MLRLLALLNLFPISQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRSL
HKGLDSAVEVCVVGNYGYSQQQLQVYSKTGFNCDGKLGNEVTFYQLNLYVNQT
DIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVGGVL
ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA
YRS
```

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio coestimulador, o una porción del mismo, de 4-1BB humano (por ejemplo, n° de adhesión Q07011, p. ej., de los aminoácidos 214 a 255 de SEQ ID NO: 19). En algunas

formas de realización, un dominio coestimulador es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a los aminoácidos 214 a 255 de SEQ ID NO: 19, o una porción de la misma.

5 SEQ ID NO: 19

MGNSCYNIVATLLLVNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA
GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQ
ELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPA
10 DLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFLLRFSVVKGRGRKLL
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

En algunas formas de realización, un dominio coestimulador es o incluye una secuencia que es al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a SEQ ID NO: 44, 57 o 116, o una parte de la misma.

Un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena descrito en este documento puede incluir un dominio coestimulador que incluye una secuencia de aminoácidos de cualquier isoforma de un polipéptido transmembrana endógeno de mamífero (por ejemplo, humano) que tiene un dominio coestimulador que incluye, por ejemplo, una isoforma de: CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C o B7-H3 (incluido, sin limitación, un homólogo mamífero o humano de cualquiera de estos polipéptidos).

En algunas formas de realización, un dominio coestimulador, o una porción del mismo, de un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con un dominio coestimulador de uno o más de los siguientes: CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C, o B7-H3. En algunas formas de realización, un dominio coestimulador, o una porción del mismo, de un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con un dominio coestimulador de uno o más de un polipéptido transmembrana endógeno de mamífero (por ejemplo, humano): una cadena α de un receptor de células T, una cadena β del receptor de células T, una cadena ζ del receptor de células T, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C o B7-H3 (incluido, sin limitación, un homólogo mamífero o humano de cualquiera de estos polipéptidos).

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un dominio coestimulador que es un dominio coestimulador quimérico que tiene porciones de un dominio coestimulador de dos o más polipéptidos transmembrana endógenos de mamíferos (por ejemplo, humanos) que incluyen, sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C o B7-H3 (incluido, sin limitación, un homólogo mamífero o humano de cualquiera de estos polipéptidos), de modo que las dos o más porciones de los dominios transmembrana juntas constituyen un dominio coestimulador funcional. En algunas formas de realización, dicha porción de un dominio coestimulador quimérico puede incluir una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una porción correspondiente de un dominio coestimulador de tipo salvaje.

Un dominio coestimulador de un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena descrito en este documento puede tener cualquier longitud adecuada. Por ejemplo, un dominio coestimulador puede tener una longitud de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 190 aminoácidos, aproximadamente 180 aminoácidos, aproximadamente 170 aminoácidos, aproximadamente 160 aminoácidos, aproximadamente 150 aminoácidos, aproximadamente 140 aminoácidos, aproximadamente 130 aminoácidos, aproximadamente 120 aminoácidos, aproximadamente 110 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 95 aminoácidos, aproximadamente 90 aminoácidos, aproximadamente 85 aminoácidos, aproximadamente 80 aminoácidos, aproximadamente 75 aminoácidos, aproximadamente 70 aminoácidos, aproximadamente 65 aminoácidos, aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 55 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 45 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos, aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos o aproximadamente 25 aminoácidos (inclusive); de aproximadamente 25 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 190 aminoácidos, aproximadamente 180 aminoácidos, aproximadamente 170 aminoácidos, aproximadamente 160 aminoácidos, aproximadamente 150 aminoácidos, aproximadamente 140 aminoácidos, aproximadamente 130 aminoácidos, aproximadamente 120 aminoácidos, aproximadamente 110 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 95 aminoácidos, aproximadamente 90 aminoácidos, aproximadamente 85 aminoácidos, aproximadamente 80 aminoácidos, aproximadamente 75 aminoácidos, aproximadamente 70 aminoácidos, aproximadamente 65 aminoácidos, aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 55 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos,

[illegible]

aproximadamente 150 aminoácidos, aproximadamente 140 aminoácidos, aproximadamente 130 aminoácidos, aproximadamente 120 aminoácidos, aproximadamente 110 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 95 aminoácidos o aproximadamente 90 aminoácidos (inclusive); de aproximadamente 90 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, de aproximadamente 190 aminoácidos, de aproximadamente 180 aminoácidos, de aproximadamente 170 aminoácidos, de aproximadamente 160 aminoácidos, de aproximadamente 150 aminoácidos, de aproximadamente 140 aminoácidos, de aproximadamente 130 aminoácidos, de aproximadamente 120 aminoácidos, de aproximadamente 110 aminoácidos o de aproximadamente 100 aminoácidos (inclusive); de aproximadamente 100 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, de aproximadamente 190 aminoácidos, de aproximadamente 180 aminoácidos, de aproximadamente 170 aminoácidos, de aproximadamente 160 aminoácidos, de aproximadamente 150 aminoácidos, de aproximadamente 140 aminoácidos, de aproximadamente 130 aminoácidos o aproximadamente 120 aminoácidos (inclusive); de aproximadamente 120 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 190 aminoácidos, aproximadamente 180 aminoácidos, aproximadamente 170 aminoácidos, aproximadamente 160 aminoácidos, aproximadamente 150 aminoácidos, aproximadamente 140 aminoácidos o aproximadamente 130 aminoácidos (inclusive); de aproximadamente 130 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 190 aminoácidos, aproximadamente 180 aminoácidos, aproximadamente 170 aminoácidos, aproximadamente 160 aminoácidos, aproximadamente 150 aminoácidos o aproximadamente 140 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 140 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 190 aminoácidos, aproximadamente 180 aminoácidos, aproximadamente 170 aminoácidos o aproximadamente 160 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 160 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 190 aminoácidos, aproximadamente 180 aminoácidos o aproximadamente 170 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 170 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 190 aminoácidos o aproximadamente 180 aminoácidos (inclusive); aproximadamente 180 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos o aproximadamente 190 aminoácidos (inclusive); o aproximadamente 190 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos (inclusive).

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico de cadena múltiple incluye dos o más dominios coestimuladores, por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco, o más dominios coestimuladores. En algunas formas de realización, los dos o más dominios coestimuladores son idénticos (por ejemplo, tienen la misma secuencia de aminoácidos). En algunas formas de realización, los dominios coestimuladores no son idénticos. Por ejemplo, los dominios coestimuladores se pueden seleccionar de diferentes polipéptidos transmembrana endógenos de mamíferos (por ejemplo, humanos), incluidos, sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C o B7-H3 (incluido, sin limitación, un homólogo mamífero o humano de cualquiera de estos polipéptidos). En algunas formas de realización, los dos o más dominios coestimuladores pueden diferir entre sí por una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, los dos o más dominios coestimuladores exhiben al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia entre sí.

45 **Motivos de activación basados en tirosina del inmunorreceptor (ITAM)**

Los ITAM incluyen una tirosina separada de una leucina o isoleucina por otros dos aminoácidos cualesquiera y, por lo tanto, pueden representarse como, por ejemplo, Tyr-XX-Leu/Ile. Los ITAM suelen repetirse (por ejemplo, dos o más veces) en las colas citoplasmáticas de ciertas proteínas de la superficie celular del sistema inmunológico y suelen estar separados por entre seis y ocho aminoácidos.

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un ITAM, o una porción del mismo, de un polipéptido endógeno de mamífero (por ejemplo, humano), en donde el polipéptido endógeno de mamífero (por ejemplo, humano) se selecciona del grupo de: CD3 (también denominado CD3 zeta), CD3 δ (CD3 delta), CD3 ϵ (CD3 épsilon), CD3 γ (CD3 gamma), DAP12, FC ϵ R1 γ (cadena gamma del receptor I de Fc épsilon), FcR γ , FcR δ , CD35, CD22, CD79A (cadena alfa de proteína asociada al complejo del receptor de antígeno), CD79B (cadena beta de proteína asociada al complejo del receptor de antígeno) y CD66d. Las letras "CD" en la oración anterior significan "grupo de diferenciación". Por ejemplo, CD3 significa "grupo de diferenciación 3".

Cualquier ITAM, o parte del mismo, que sirva para mediar la señalización en una proteína transmembrana endógena de mamífero (por ejemplo, humana) adecuada para su uso de acuerdo con las composiciones y los métodos descritos en este documento. En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un ITAM, o una porción del mismo, de CD3 zeta humano (por ejemplo, N $^{\circ}$ de adhesión P20963, por ejemplo, un ITAM presente en los aminoácidos 52 - 164

de SEQ ID NO: 17, o una porción de la misma; o SEQ ID NO: 118 o una porción de la misma). En algunas formas de realización, un ITAM comprende una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, al menos 82 %, al menos 84 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 96 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a: la secuencia de aminoácidos 52-165 de SEQ ID NO: 17 (o una porción de la misma), o la secuencia de SEQ ID NO: 118 (o una porción de la misma)

SEQ ID NO: 17

```
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR
```

En algunas formas de realización, un ITAM comprende una secuencia que es o incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, al menos 82 %, al menos 84 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 96 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 %) idéntica a SEQ ID NO: 48, 61 o 118, o una porción de la misma.

Como apreciarán los expertos en la materia, ciertos polipéptidos tienen dos o más isoformas que difieren al menos en su secuencia polipeptídica primaria. Por ejemplo, se pueden generar diferentes isoformas como resultado del empalme alternativo. Un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena descrito en este documento puede incluir un ITAM que incluye una secuencia de aminoácidos de cualquier isoforma de un polipéptido transmembrana de mamífero endógeno que tiene un ITAM que incluye, por ejemplo, una isoforma de mamífero (por ejemplo, humano) de: CD3ζ, CD3D, CD3E, CD3G, DAP12, FCERIG, FcRy, FcRft, CD35, CD22, CD79A, CD79B o CD66d.

En algunas formas de realización, un ITAM, o una porción del mismo, de un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con un ITAM de uno o más de un ITAM en una proteína transmembrana endógena de mamífero (por ejemplo, humana), como CD3ζ, CD3D, CD3E, CD3G, DAP12, FCERIG, FcRy, FcRft, CD35, CD22, CD79A, CD79B o CD66d. Por ejemplo, la tirosina y la leucina o isoleucina de un ITAM podrían conservarse, mientras que los dos aminoácidos que los separan podrían reemplazarse por aminoácidos diferentes.

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena incluye un ITAM que es un ITAM quimérico que tiene porciones de un ITAM de dos o más polipéptidos transmembrana endógenos de mamíferos (por ejemplo, humanos) que incluyen, sin limitación, CD3ζ, CD3D, CD3E, CD3G, DAP12, FCERIG, FcRy, FcRft, CD35, CD22, CD79A, CD79B o CD66d (incluido, sin limitación, un homólogo mamífero o humano de cualquiera de estos polipéptidos), de modo que las dos o más porciones de ITAM juntas constituyen un ITAM funcional. En algunas formas de realización, dicha porción de un ITAM quimérico puede incluir una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con una porción correspondiente de un ITAM de tipo salvaje.

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico de cadena múltiple incluye dos o más ITAM, por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco, o más ITAM. En algunas formas de realización, los dos o más ITAM son idénticos (por ejemplo, tienen la misma secuencia de aminoácidos). En algunas formas de realización, los dos o más ITAM no son idénticos. Por ejemplo, los ITAM se pueden seleccionar de diferentes polipéptidos transmembrana endógenos de mamíferos (por ejemplo, humanos), incluidos, sin limitación, CD3ζ, CD3D, CD3E, CD3G, DAP12, FCERIG, FcRy, FcRft, CD35, CD22, CD79A, CD79B (incluido, sin limitación, un homólogo mamífero o humano de cualquiera de estos polipéptidos). En algunas formas de realización, los dos o más ITAM pueden diferir entre sí por una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos.

Ácidos nucleicos

También se divulgan en este documento ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única, receptores de antígenos quiméricos de cadena única y receptores de antígenos quiméricos multicadena. También se describe en este documento un conjunto de ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de cadena única que forman un polipéptido quimérico multicadena (por ejemplo, donde al menos un polipéptido de cadena única que forma el polipéptido quimérico multicadena está codificado por cada ácido nucleico en el conjunto).

Vectores

Se describen en este documento vectores que incluyen cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en este documento. Un "vector" según la presente divulgación es un polinucleótido capaz de inducir la expresión de una proteína recombinante (por ejemplo, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena) en una célula de mamífero. Un vector divulgado en este documento puede ser, por

ejemplo, en forma circular o linealizada. Los ejemplos no limitantes de vectores incluyen plásmidos, vectores SV40, vectores virales adenovirales y vectores de virus adenoasociados (AAV). Los ejemplos no limitantes de vectores incluyen vectores lentivirales o vectores retrovirales, por ejemplo, vectores gamma-retrovirales. Véase, por ejemplo, Car lens et al., Exp. Hematol 28(10):1137-1146, 2000; Park et al., Trends Biotechnol. 29(11):550-557, 2011; y Alonso-Camino et al., Mol Ther. Nucleic Acids 2:e93, 2013 Los ejemplos no limitantes de vectores retrovirales incluyen aquellos derivados del virus de la leucemia murina de Moloney, el virus del sarcoma mieloproliferativo, el virus de células madre embrionarias murinas, el virus de células madre murinas, el virus formador de focos en el bazo o el virus adenoasociado. Se describen ejemplos no limitativos de vectores retrovirales, por ejemplo, en los Números de Patente de EE. UU. 5.219.740 y 6.207.453; Miller y col., BioTechniques 7:980-990, 1989; Miller, Human Gene Therapy 1:5-14, 1990; Scarpa y col., Virology 180:849-852, 1991; Burns y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 90:8033-8037, 1993; y Boris-Lawrie et al., Cur Opin. Genet. Develop. 3:102-109, 1993 Se describen vectores lentivirales ejemplares, por ejemplo, en Wang et al., J Immunother 35(9):689-701, 2003; Cooper et al., Blood 101:1637-1644, 2003; Verhoeven et al., Methods Mol. Biol. 506:97-114, 2009; y Cavalieri et al., Blood 102(2):497-505, 2003.

15 Vectores ejemplares, en los que se puede insertar cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en este documento, se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., Eds. "Current Protocols in Molecular Biology", Current Protocols, 1993; y Sambrook et al., Eds. "Molecular Cloning: Laboratory Manual", 2.^a edición, Cold Spring Harbor Press, 1989.

20 En algunas formas de realización, los vectores incluyen, además un promotor y/o potenciador unido operativamente a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en este documento. Los ejemplos no limitantes de promotores incluyen promotores de citomegalovirus humano (CMV), fosfoglicerato quinasa 1 de ratón, adenovirus de polioma, hormona estimulante de la tiroides α , vimentina, virus de simio 40 (SV40), factor de necrosis tumoral, β -globina, α -fetoproteína, γ -globina, β -interferón, γ -glutamyl transferasa, ubiquitina C humana (UBC), virus del tumor mamario de ratón (MMTV), virus del sarcoma de Rous, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, β -actina, metalotioneína II (MT II), amilasa, EF1 α humano, cathepsina, receptor muscarínico M1, LTR retroviral (por ejemplo, virus de la leucemia de células T humanas HTLV), AAV ITR, interleucina-2, collagenasa, factor de crecimiento derivado de plaquetas, adenovirus E2, estromelina, MX murino, insulina de rata, proteína regulada por glucosa 78, virus de la inmunodeficiencia humana, proteína regulada por glucosa 94, α -2-macroglobulina, MHC de clase I, HSP70, proliferina, cadena ligera de inmunoglobulina, receptor de células T, HLA DQ α , HLA DQ β , receptor de interleucina-2, MHC de clase II, prealbúmina (transtiretina), elastasa I, albúmina, c-fos, molécula de adhesión celular neural (NCAM), histona H2B, hormona de crecimiento de rata, amiloide sérico humano (SAA), creatinina quinasa muscular, troponina I (TN I) y virus de la leucemia del mono gibbon (GALV). En algunas formas de realización, el promotor puede ser un promotor inducible o un promotor constitutivo. Se conocen ejemplos adicionales de promotores en la técnica.

35 En algunos ejemplos, los vectores divulgados en este documento incluyen, además una secuencia poli(A), que está operativamente unida y posicionada en 3' con respecto a la secuencia que codifica el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o cualquiera de los polipéptidos que componen el receptor de antígeno quimérico multicadena. Los ejemplos no limitantes de una secuencia poli(A) incluyen aquellos derivados de la hormona de crecimiento bovino (Woychik et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 81(13): 3944-3948, 1984 y Patente de EE. UU. N° 5.122.458), globina de ratón, globina-a de ratón (Orkin et al., EMBO J 4(2): 453-456, 1985), colágeno humano, virus del polioma (Batt et al., Mol Biol Cell 15(9):4783-4790, 1995), el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV TK), la señal de poliadenilación del gen de la cadena pesada de IgG (EE. UU.) Número de publicación de solicitud de patente 2006/0040354), hormona de crecimiento humana (hGH) (Szymanski et al., Mol Therapy 15(7):1340-1347, 2007), sitio poli(A) SV40, p. ej., sitio poli(A) tardío y temprano SV40 (Schenk et al., Mol. Cell Biol. 12(12):5386-5393, 1992). En algunas formas de realización, la secuencia poli(A) incluye un elemento ascendente altamente conservado (AATAAA) Esta secuencia AATAAA puede, por ejemplo, sustituirse con otras secuencias de hexanucleótidos con homología con AATAAA que son capaces de señalar la poliadenilación, incluyendo, por ejemplo, ATTAAA, AGTAAA, CATAAA, TATAAA, GATAAA, ACTAAA, AATATA, AAGAAA, AATAAT, AAAAAA, AATGAA, AATCAA, AACAAA, AATCAA, AATAAC, AATAGA, AATTAA y AATAAG. Véase, por ejemplo, WO 06012414 A2).

50 Una secuencia poli(A) puede ser, por ejemplo, un sitio de poliadenilación sintético. Véase, por ejemplo, Levitt y otros, Genes Dev 3(7): 1019-1025, 1989). En algunos ejemplos, la secuencia apoli(A) puede ser la señal de poliadenilación de la neuropilina-1 soluble: AAATAAAATACGAAATG. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de secuencias de poli(A). También se conocen en la técnica ejemplos y aspectos adicionales de vectores.

55 Métodos para introducir un ácido nucleico o vectores en una célula de mamífero

Se pueden utilizar diversos métodos conocidos en la técnica para introducir cualquiera de los ácidos nucleicos y vectores descritos en este documento en una célula de mamífero (por ejemplo, cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento, por ejemplo, cualquiera de las células T (por ejemplo, células T humanas) descritas en este documento) Los ejemplos no limitativos de métodos que se pueden utilizar para introducir un ácido nucleico o un vector en una célula de mamífero incluyen lipofección, transfección, electroporación, microinyección, transfección con fosfato de calcio, transfección basada en dendrímeros, transfección con polímeros catiónicos, compresión celular, sonoporación, transfección óptica, impalección, administración hidrodinámica, magnetofección, transducción viral (por ejemplo, transducción adenoviral y lentiviral) y transfección con nanopartículas. Se conocen en la técnica métodos adicionales para introducir un ácido nucleico o un vector en una célula de mamífero.

Células de mamíferos

5 También se divulgan en este documento células de mamíferos que incluyen cualquiera de los ácidos nucleicos o vectores descritos en este documento. En algunas formas de realización, la célula de mamífero se obtiene previamente de un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano, por ejemplo, un sujeto humano identificado o diagnosticado con cáncer).

10 Los ejemplos no limitantes de células de mamíferos incluyen una célula T (por ejemplo, una célula T humana). Los ejemplos no limitantes de células T (por ejemplo, células T humanas) incluyen, por ejemplo, un timocito inmaduro, un linfocito de sangre periférica, una célula T ingenua, un precursor de célula T_H pluripotente, una célula progenitora linfóide, una célula T_{reg}, una célula T de memoria, una célula T_H17, una célula T_H22, una célula T_H9, una célula T_H2, una célula T_H1, una célula T_H3, una célula T $\gamma\delta$, una célula T $\alpha\beta$, una célula T_{reg} y una célula T infiltrante de tumor. Otros ejemplos de células T (por ejemplo, una célula T humana) incluyen una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺ y una célula T asesina natural. Otros ejemplos de células de mamíferos incluyen un mastocito, un macrófago, un neutrófilo, una célula dendrítica, un basófilo, un eosinófilo y una célula asesina natural.

Hormonas y análogos hormonales

20 Los ejemplos no limitantes de hormonas incluyen estrógeno (17 β -estradiol), progesterona, testosterona y dihidrotestosterona. Los ejemplos no limitantes de análogos hormonales incluyen análogos de la hormona estrógeno, análogos de la hormona progesterona y análogos de la hormona andrógeno.

25 Los ejemplos no limitantes de análogos de la hormona estrógeno incluyen: afimoxifeno (también conocido como 4-hidroxitamoxifeno, 4-OHT, 4-HT y OHTAM); moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), como clomifeno, ormeloxifeno, raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno, lasofoxifeno y ospemifeno; estradiol; estrona; raloxifeno; estriol; genisteína; fitoestrógenos (por ejemplo, isoflavonas, como genisteína, daidzeína, formononetina y gliciteína; cumestanos, como cumestrol y repensol y trifoliol; y lignanos, como lariciresinol, matairesinol, pinoresinol, secoisolariciresinol, podofilotoxina y esteganacina); y xenoestrógenos (p. ej., dietilestilbestrol, etinilestradiol, hidroxianisol butilado, eritrosina, alcanfor (p. ej., alcanfor de 4-metilbencilideno), parabenos (p. ej., metilparabeno, etilparabeno y propilparabeno), atrazina, diclorodifenildicloroetileno, diclorodifeniltricloroetano, metoxicloro, dieldrina, endosulfán, heptacloro, lindano, fenoles (p. ej., bisfenol A y nonilfenol), bifenilos (p. ej., monoclorobifenilo y diclorobifenilo), ftalatos (p. ej., ftalato de di-2-etilhexilo, ftalato de diisododecilo y ftalato de diisononilo) y metaloestrógenos). En algunas formas de realización, un análogo de la hormona estrógeno puede ser, por ejemplo, mifepristona (también conocida como RU-486). En algunas formas de realización, un análogo de la hormona estrógeno puede ser un modulador selectivo del receptor de progesterona (SPRM), como onapristona (ZK98299), lonaprisán (ZK230211, BAY86-5044), APR19, EC304, WAY-255348, ORG31710, asoprisnil (J867), telapristona (Proellex, CDB-4124) y CDB-2914 (acetatos de ulipristal).

40 Los ejemplos no limitantes de análogos de la hormona progesterona incluyen moduladores selectivos del receptor de progesterona (SPRM), como onapristona (ZK98299), lonaprisán (ZK230211, BAY86-5044), APR19, EC304, WAY-255348, ORG31710, asoprisnil (J867), telapristona (Proellex, CDB-4124) y CDB-2914 (acetatos de ulipristal).

45 Los ejemplos no limitantes de análogos de hormonas androgénicas incluyen enobosarm (también conocido como ostarina, MK-2866, GTX-024 y S-22), BMS-564,929, LGD-4033 (ligandrol), AC-262,356, JNJ-28330835, LGD-2226, LGD-3303, S-40503, S-23, RAD140, acetotiolutamida, Andarina, LG-121071, TFM-4AS-1 y YK-11.

Como se puede apreciar en la técnica, el estrógeno o un análogo de la hormona estrógeno se puede utilizar junto con un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena que incluye un dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno.

50 Composiciones y kits

También se describen en este documento composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que incluyen cualquiera de los ácidos nucleicos, vectores, conjuntos de ácidos nucleicos, conjuntos de vectores o células de mamíferos descritos en este documento. Por ejemplo, se describe en este documento una composición que incluye cualquiera de los ácidos nucleicos o conjuntos de ácidos nucleicos descritos en este documento, o cualquiera de los vectores o conjuntos de vectores descritos en este documento y un disolvente o portador farmacéuticamente aceptable.

60 En algunas formas de realización, una composición puede ser cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento (por ejemplo, cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento obtenidas previamente de un sujeto, por ejemplo, un sujeto identificado o diagnosticado con cáncer) que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena única, receptores de antígenos quiméricos de cadena única o receptores de antígenos quiméricos multicadena descritos en este documento. En una composición que incluye cualquiera de las células de mamíferos descritas en este documento, la composición puede incluir además un medio de cultivo celular o un tampón farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Se puede formular una composición que incluya cualquiera de las células de mamíferos descritas en este documento para administración intravenosa o intraarterial.

También se describen kits que incluyen una o más de cualquiera de las composiciones descritas en este documento. Por ejemplo, un kit puede incluir cualquiera de las composiciones descritas en este documento y una o más dosis de una hormona o análogo de hormona formulada para administración a un sujeto (por ejemplo, formulada para administración oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea). En algunas formas de realización, un kit puede incluir además instrucciones para realizar cualquiera de los métodos descritos en este documento.

Métodos para inducir la localización en la membrana de un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un polipéptido quimérico multicadena en una célula de mamífero

También se describen en este documento métodos para inducir la localización en la membrana de un polipéptido quimérico de cadena única (p. ej., cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena únicas descritos en este documento), un receptor de antígeno quimérico de cadena única (p. ej., cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena únicas descritos en este documento) o un receptor de antígeno quimérico multicadena (p. ej., cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos multicadenas descritos en este documento) en una célula de mamífero (p. ej., cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento) que incluyen: poner en contacto una célula de mamífero que expresa un polipéptido quimérico de cadena única (p. ej., cualquiera de los polipéptidos quiméricos de cadena únicas descritos en este documento), un receptor de antígeno quimérico de cadena única (p. ej., cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena únicas descritos en este documento) en este documento), o un receptor de antígeno quimérico multicadena (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quimérico multicadena descritos en este documento) con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de unión a antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula, respectivamente.

Algunas formas de realización de estos métodos incluyen, además la introducción de un ácido nucleico que codifica el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena en una célula de mamífero (por ejemplo, cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento o conocidas en la técnica) para generar la célula de mamífero que expresa el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena, respectivamente. En algunos ejemplos de estos métodos, la célula de mamífero es una célula T (por ejemplo, una célula T CD5+, una célula T CD4+, una célula T de memoria, una célula T_{reg} y una célula T asesina natural). En algunos ejemplos, la célula de mamífero (por ejemplo, cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento) es una célula de mamífero obtenida previamente de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que ha sido identificado o diagnosticado con un cáncer, por ejemplo, cualquiera de los cánceres descritos en este documento). Algunas formas de realización de estos métodos incluyen, además la obtención de la célula de mamífero del sujeto.

En algunas formas de realización de cualquiera de estos métodos, el paso de contacto se realiza *in vitro*. En algunas formas de realización de cualquiera de estos métodos, la etapa de contacto se realiza en un mamífero (por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que tiene un cáncer, por ejemplo, cualquiera de los cánceres descritos en este documento). En algunas formas de realización, la etapa de contacto da como resultado el tratamiento del cáncer en un mamífero (por ejemplo, un ser humano).

Los ejemplos no limitantes de cáncer que se pueden tratar utilizando cualquiera de los métodos divulgados en este documento incluyen: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, sarcoma de Kaposi, linfoma, cáncer anal, cáncer de apéndice, tumor teratoide/rabdoide, carcinoma de células basales, cáncer de los conductos biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer cerebral, cáncer de mama, tumor bronquial, tumor carcinoide, tumor cardíaco, cáncer de cuello uterino, cordoma, leucemia linfocítica crónica, neoplasia mieloproliferativa crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, cáncer de los conductos biliares, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, estesioblastoma, sarcoma de Ewing, cáncer ocular, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal, tumor de células germinales, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer de hígado, cáncer de hipofaringe, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia mieloide crónica, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de boca, cáncer oral, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de glándula salival, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer de garganta, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer de útero, cáncer de vagina y cáncer de vulva.

En algunas formas de realización de cualquiera de estos métodos, los métodos dan como resultado una disminución de la carga tumoral (por ejemplo, masa y/o volumen tumoral) en un sujeto. Por ejemplo, cualquiera de los métodos descritos en este documento puede dar como resultado al menos aproximadamente un 1 % a aproximadamente 99% (e.g., aproximadamente 1 % a aproximadamente 98%, aproximadamente 96%, aproximadamente 94%, aproximadamente 92%, aproximadamente 90%, aproximadamente 88%, aproximadamente 86%, aproximadamente 84%, aproximadamente 82%, aproximadamente 80%, aproximadamente 78%, aproximadamente 76%, aproximadamente 74%, aproximadamente 72%, aproximadamente 70%, aproximadamente 65%, aproximadamente 60%, aproximadamente 55%, aproximadamente 50%, aproximadamente 45%, aproximadamente 40%, aproximadamente 35%, aproximadamente 30%, aproximadamente 25%,

[illegible]

[illegible]

[illegible]

aproximadamente 86%, aproximadamente 84%, aproximadamente 82%, aproximadamente 80%, aproximadamente 78%, o aproximadamente 76% (inclusive); aproximadamente 76% a aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 96%, aproximadamente 94%, aproximadamente 92%, aproximadamente 90%, aproximadamente 88%, aproximadamente 86%, aproximadamente 84%, aproximadamente 82%, aproximadamente 80%, o aproximadamente 78% (inclusive); aproximadamente 78% a aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 96%, aproximadamente 94%, aproximadamente 92%, aproximadamente 90%, aproximadamente 88%, aproximadamente 86%, aproximadamente 84%, aproximadamente 82%, o aproximadamente 80% (inclusive); aproximadamente 80% a aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 96%, aproximadamente 94%, aproximadamente 92%, aproximadamente 90%, aproximadamente 88%, aproximadamente 86%, o aproximadamente 84% (inclusive); aproximadamente 84% a aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 96%, aproximadamente 94%, aproximadamente 92%, aproximadamente 90%, aproximadamente 88%, o aproximadamente 86% (inclusive); aproximadamente 86% a aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 96%, aproximadamente 94%, aproximadamente 92%, o aproximadamente 90% (inclusive); aproximadamente 90% a aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 96%, aproximadamente 94%, o aproximadamente 92% (inclusive); aproximadamente 92% a aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 96%, o aproximadamente 94% (inclusive); aproximadamente 94% a aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 96% (inclusive); o aproximadamente 96% a aproximadamente 99% o aproximadamente 98% (inclusive)) reducción en la tasa de progresión de un cáncer en un sujeto (por ejemplo, en comparación con la tasa de progresión de un cáncer en el sujeto antes de un tratamiento o en un sujeto de control o una población de control de sujetos que tienen el mismo cáncer y no recibieron tratamiento o un tratamiento diferente).

25		En algunas formas de realización de cualquiera de estos métodos, los métodos dan como resultado un aumento en el tiempo de supervivencia de un cáncer en un sujeto. Por ejemplo, cualquiera de los métodos descritos en este documento puede dar como resultado un aumento de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 800 % (por ejemplo,							
30		aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 750 %, aproximadamente el 700 %, aproximadamente el 650 %, aproximadamente el 600 %, aproximadamente el 550 %, aproximadamente el 500 %, aproximadamente el 450 %, aproximadamente el 400 %, aproximadamente el 350 %, aproximadamente el 300 %, aproximadamente el 250 %, aproximadamente el 200 %, aproximadamente el 150 %, aproximadamente el 100 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 10 % o aproximadamente el 5 % (inclusive); aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 800 %, aproximadamente el 750 %,							
35		aproximadamente el 700 %, aproximadamente el 650 %, aproximadamente el 600 %, aproximadamente el 550 %, aproximadamente el 500 %, aproximadamente el 450 %, aproximadamente el 40... 350 %, aproximadamente 300 %, aproximadamente 250 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 20 % o aproximadamente 10 % (inclusive); aproximadamente 10 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %,							
40		aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 %, aproximadamente 300 %, aproximadamente 250 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 40 % o aproximadamente 20 % (inclusive); aproximadamente 20 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %,							
45		aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 %, aproximadamente 300 %, aproximadamente 250 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 60 % o aproximadamente 40 % (inclusive); aproximadamente 40 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %,							
50		aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 %, aproximadamente 300 %, aproximadamente 250 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 80 % o aproximadamente 60 % (inclusive); aproximadamente 60 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %,							
55		aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 %, aproximadamente 300 %, aproximadamente 250 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 80 % (inclusive); aproximadamente 80 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %,							
60		aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 %, aproximadamente 300 %, aproximadamente 250 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 150 %, o aproximadamente 100 % (inclusive); aproximadamente 100 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %,							
65		aproximadamente 350 %, aproximadamente 300 %, aproximadamente 250 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 150 %, o aproximadamente 100 % (inclusive); aproximadamente 100 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %,							

	aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 % aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 %, aproximadamente 300 %, aproximadamente 250 % o aproximadamente 200 % (inclusive); aproximadamente 200 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %,
5	aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 %, aproximadamente 300 % o aproximadamente 250 % (inclusive); aproximadamente 250 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 %, aproximadamente 300 % o aproximadamente 250 % (inclusive); aproximadamente 250 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 % o aproximadamente 300 % (inclusive);
10	aproximadamente 300 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 % o aproximadamente 350 % (inclusive); aproximadamente 350 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 % o aproximadamente 400 % (inclusive); aproximadamente 400 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 % o aproximadamente 400 % (inclusive); aproximadamente 400 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 % o aproximadamente 450 % (inclusive); aproximadamente 450 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 550 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 400 %, aproximadamente 350 % o aproximadamente 500 % (inclusive); aproximadamente 500 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 % o aproximadamente 550 % (inclusive); aproximadamente 550 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 650 %, aproximadamente 600 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 700 % o aproximadamente 650 % (inclusive); aproximadamente 650 % a aproximadamente 800 %, aproximadamente 750 % o aproximadamente 700 % (inclusive); aproximadamente entre un 700 % y un 800 % o aproximadamente entre un 750 % (inclusive); o aproximadamente entre un 750 % y un 800 % (inclusive)) de aumento en el tiempo de supervivencia de un cáncer en un sujeto (por ejemplo, en comparación con el tiempo de supervivencia de un sujeto de control o una población de sujetos de control que tienen el mismo cáncer y no reciben tratamiento o reciben un tratamiento diferente).
25	

30 Métodos para alterar reversiblemente la localización de la membrana de un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un polipéptido quimérico multicadena en una célula de mamífero

También se divulgan en este documento métodos para alterar reversiblemente la localización de la membrana de un polipéptido quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos de cadena única descritos en este documento), un receptor de antígeno quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quimérico de cadena única descritos en este documento), o un receptor de antígeno quimérico multicadena (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quimérico multicadena descritos en este documento) en una célula de mamífero que incluyen: (a) poner en contacto una célula de mamífero (por ejemplo, cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento) que expresa un polipéptido quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos de cadena única descritos en este documento), un receptor de antígeno quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento), o un receptor de antígeno quimérico multicadena (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos multicadena descritos en este documento) con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula, respectivamente; y (b) poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad reducida de la hormona o el análogo de hormona que da como resultado un nivel disminuido del polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula de mamífero (por ejemplo, en comparación con el nivel en el lado extracelular de la membrana plasmática en el paso (a)). En algunas formas de realización, el nivel disminuido en el paso (b) es al menos una disminución del 5 %, al menos una disminución del 10 %, al menos una disminución del 15 %, al menos una disminución del 20 %, al menos una disminución del 25 %, al menos una disminución del 30 %, al menos una disminución del 35 %, al menos una disminución del 40 %, al menos una disminución del 45 %, al menos una disminución del 50 %, al menos una disminución del 55 %, al menos una disminución del 60 %, al menos una disminución del 65 %, al menos una disminución del 70 %, al menos una disminución del 75 %, al menos una disminución del 80 %, al menos una disminución del 85 %, al menos una disminución del 90 %, al menos una disminución del 95 %, o al menos una disminución del 99 % en el nivel del polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática en el paso (a). En algunas formas de realización, el nivel disminuido en el paso (b) es una disminución del 100 % en el nivel del polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática en el paso (a). En algunas formas de realización, la célula de mamífero no entra en contacto con ninguna hormona o hormona análoga a la hormona en el paso (b). Algunas formas de realización de estos métodos incluyen, además: (c) poner en contacto la célula de mamífero (por ejemplo, cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento) con una mayor cantidad de la hormona o del análogo de la hormona que da como resultado un mayor nivel del polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula en comparación con el nivel del paso (b).

Algunas formas de realización de cualquiera de estos métodos incluyen, además la introducción de un ácido nucleico que codifica el polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero (por ejemplo, cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento) para generar la célula de mamífero que expresa el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula de mamífero es una célula T (por ejemplo, una célula T humana). En algunas formas de realización, la célula T (por ejemplo, célula T humana) se selecciona del grupo de una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula T_{reg} y una célula T asesina natural. En algunas formas de realización, la célula de mamífero es una célula de mamífero obtenida previamente de un sujeto (por ejemplo, un ser humano). En algunos ejemplos, el sujeto (por ejemplo, humano) ha sido identificado o diagnosticado con un cáncer (por ejemplo, cualquiera de los tipos de cáncer descritos en este documento). Algunas formas de realización incluyen, además la obtención de la célula de mamífero del sujeto.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el paso de contacto se realiza *in vitro*. En algunas formas de realización, la etapa de contacto se realiza en un mamífero (por ejemplo, en un sujeto). En algunas formas de realización, la etapa de contacto da como resultado el tratamiento del cáncer en un mamífero (por ejemplo, un ser humano).

Los ejemplos no limitantes de cáncer que se pueden tratar utilizando cualquiera de los métodos divulgados en este documento incluyen: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, sarcoma de Kaposi, linfoma, cáncer anal, cáncer de apéndice, tumor teratoide/rabdoide, carcinoma de células basales, cáncer de los conductos biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer cerebral, cáncer de mama, tumor bronquial, tumor carcinoide, tumor cardíaco, cáncer de cuello uterino, cordoma, leucemia linfocítica crónica, neoplasia mieloproliferativa crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, cáncer de los conductos biliares, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, estesonuroblastoma, sarcoma de Ewing, cáncer ocular, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal, tumor de células germinales, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer de hígado, cáncer de hipofaringe, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia mieloide crónica, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de boca, cáncer oral, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de glándula salival, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer de garganta, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer de útero, cáncer de vagina y cáncer de vulva.

Métodos para controlar la toxicidad de un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un polipéptido quimérico multicadena en una célula de mamífero alterando reversiblemente la localización de la membrana del mismo

En algunas formas de realización, las composiciones y/o los métodos divulgados en este documento se pueden usar para matar selectivamente células cancerosas en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) en presencia de una hormona o un análogo de hormona que se une a un LBD presente en el polipéptido (por ejemplo, un polipéptido quimérico de cadena única, un receptor de antígeno quimérico de cadena única o un receptor de antígeno quimérico multicadena). En algunas formas de realización, en presencia de la hormona o análogo de hormona, el polipéptido (por ejemplo, el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena) se localiza en la superficie extracelular de una célula de mamífero, presentando su dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un scFv o cualquier otro dominio de unión a antígeno descrito en este documento o conocido en la técnica) en el exterior de la célula. El polipéptido puede entonces reconocer el antígeno al que se une y, por lo tanto, puede matar selectivamente una célula objetivo que exprese el antígeno en su superficie.

En algunas formas de realización, la localización del polipéptido (por ejemplo, el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única o el receptor de antígeno quimérico multicadena) en la superficie extracelular puede causar toxicidad en el sujeto. Esta toxicidad puede ser causada, por ejemplo, por una tormenta de citocinas (también denominada hipercitocinemia o síndrome de liberación de citocinas). En algunas formas de realización, un sujeto que experimenta toxicidad debido a la localización inducida por hormonas o análogos de hormonas del polipéptido en la superficie extracelular puede ser tratado reduciendo la dosis de la hormona o análogo de hormona administrada al sujeto, o eliminando por completo el tratamiento con hormonas o análogos de hormonas. Tal reducción de dosis o eliminación del tratamiento hormonal o del análogo hormonal puede provocar que el polipéptido se elimine de la superficie celular y reducir o eliminar la presentación del dominio de unión al antígeno en la superficie celular, reduciendo o eliminando así la toxicidad en el sujeto.

Los síntomas ejemplares de toxicidad incluyen, sin limitación, fiebre alta, hinchazón, escalofríos, hipotensión, taquicardia, astenia, dolor de cabeza, sarpullido, picazón en la garganta, disnea, enrojecimiento, fatiga extrema, náuseas y edema cerebral (hinchazón en el cerebro). En algunas formas de realización, la toxicidad en un sujeto se puede determinar evaluando la presencia o gravedad de uno o más de estos síntomas en un sujeto después de la administración de una o más dosis de la hormona o análogo hormonal al sujeto. En algunas formas de realización, uno o más de estos u otros síntomas asociados con la toxicidad se pueden determinar después de introducir en un sujeto una célula de mamífero (por ejemplo, una célula T) que incluye un polipéptido quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los

polipéptidos de cadena única descritos en este documento), un receptor de antígeno quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quimérico de cadena única descritos en este documento), o un receptor de antígeno quimérico multicadena (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos multicadena descritos en este documento) que tiene un LBD, y una hormona o análogo de hormona que se une al LBD. En algunas formas de realización, el nivel determinado de uno o más de estos u otros síntomas asociados con la toxicidad se puede comparar con un nivel de referencia que está asociado con la falta de toxicidad o un nivel reducido de toxicidad. Dicho nivel de referencia puede ser, por ejemplo, el nivel de uno o más de estos u otros síntomas en el sujeto antes de la administración de la célula de mamífero, la hormona o el análogo hormonal, o ambos. Adicionalmente o alternativamente, dicho nivel de referencia puede ser el nivel de uno o más de estos u otros síntomas en un sujeto diferente al que no se le ha administrado la célula de mamífero, la hormona o el análogo de la hormona, o ambos. Los expertos en la materia conocerán métodos clínicos y de laboratorio adecuados para determinar el nivel de uno o más síntomas asociados con la toxicidad.

En algunas formas de realización, la toxicidad puede ser el resultado de una tormenta de citocinas. Tanto las citocinas proinflamatorias como las citocinas antiinflamatorias están elevadas en el suero de sujetos que experimentan una tormenta de citocinas. Los ejemplos no limitantes de citocinas que están elevadas en el suero de sujetos que experimentan una tormenta de citocinas incluyen el factor de necrosis tumoral alfa, IFN γ , IL-10, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-10, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-5. En algunas formas de realización, una o más de estas u otras citocinas asociadas con una tormenta de citocinas se determinan después de introducir en un sujeto una célula de mamífero (por ejemplo, una célula T) que incluye un polipéptido quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos de cadena única descritos en este documento), un receptor de antígeno quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quimérico de cadena única descritos en este documento), o un receptor de antígeno quimérico multicadena (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos multicadena descritos en este documento) que tiene un LBD, y una hormona o análogo de hormona que se une al LBD. En algunas formas de realización, el nivel determinado de una o más de estas u otras citocinas asociadas con una tormenta de citocinas se puede comparar con un nivel de referencia que está asociado con la falta de una tormenta de citocinas o un nivel reducido de una tormenta de citocinas. Dicho nivel de referencia puede ser, por ejemplo, el nivel de una o más de estas u otras citocinas en el sujeto antes de la administración de la célula de mamífero, la hormona o el análogo de la hormona, o ambos. Adicionalmente o alternativamente, dicho nivel de referencia puede ser el nivel de una o más de estas u otras citocinas en un sujeto diferente al que no se le ha administrado la célula de mamífero, la hormona o el análogo de la hormona, o ambos. El nivel de una citocina (por ejemplo, el nivel de citocina después de administrar a un sujeto la célula de mamífero y la hormona o análogo de hormona y/o el nivel basal de una citocina), se puede determinar mediante cualquiera de una variedad de métodos y técnicas, incluidos, sin limitación, ELISA, transferencias Western, paneles de matriz de anticuerpos, matrices multiplex, ensayos Elispot, inmunohistoquímica o cualquiera de la variedad de ensayos comerciales disponibles para determinar los niveles de citocina.

En algunas formas de realización, se divulgan métodos para tratar el cáncer (por ejemplo, cualquiera de la variedad de cánceres descritos en este documento) en un sujeto (por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano). En algunas formas de realización, los métodos para tratar el cáncer incluyen: (a) administrar a un sujeto una célula de mamífero (por ejemplo, una célula T) que incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos de cadena única descritos en este documento), un receptor de antígeno quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena única descritos en este documento), o un receptor de antígeno quimérico de cadena múltiple (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos de cadena múltiple descritos en este documento) que tiene un receptor de hormona LBD, (b) administrar al sujeto una hormona o análogo de hormona que se une al LBD, (c) determinar el nivel de uno o más síntomas asociados con toxicidad y/o el nivel de una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas, (d) comparar el nivel determinado de uno o más síntomas asociados con toxicidad y/o el nivel de una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas con un nivel basal del síntoma o citocina, y (e) reducir la cantidad de la hormona o análogo de hormona administrado al sujeto, de tal manera que se reduce el nivel determinado de uno o más síntomas asociados con la toxicidad y/o el nivel de una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas. En algunas formas de realización, el nivel de la hormona o análogo de hormona administrado al sujeto se reduce en el paso (e) en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 %. En algunas formas de realización, el nivel de la hormona o análogo de hormona administrado al sujeto se reduce en el paso (e) en un 100 % (por ejemplo, no se administra ninguna célula de mamífero al sujeto en el paso (e)). En algunas formas de realización, después de administrar la hormona o el análogo de hormona en el paso (b), el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única y/o el receptor de antígeno quimérico de cadena múltiple localizan la superficie extracelular de la célula de mamífero de manera reversible. En algunas formas de realización, después de reducir la cantidad de la hormona o análogo de hormona administrada al sujeto en el paso (e), el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única y/o el receptor de antígeno quimérico multicadena se eliminan de la superficie extracelular, reduciendo así la toxicidad (por ejemplo, uno o más síntomas asociados con la toxicidad y/o una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas). En algunas formas de realización, después de reducir la cantidad de la hormona o análogo de hormona administrada al sujeto en el paso (e), la toxicidad (por ejemplo, uno o más síntomas asociados con la toxicidad y/o una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas) se reduce en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos

- un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 %. En algunas formas de realización, después de reducir la cantidad de la hormona o análogo de hormona administrada al sujeto en el paso (e), la toxicidad (por ejemplo, uno o más síntomas asociados con la toxicidad y/o una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas) se reduce en un 100 % (por ejemplo, el sujeto no experimenta toxicidad o solo un nivel basal de toxicidad). En algunas formas de realización, después de reducir la cantidad de la hormona o análogo de hormona administrada al sujeto en el paso (e), la toxicidad (por ejemplo, uno o más síntomas asociados con la toxicidad y/o una o más citocinas asociadas con una tormenta de citocinas) se normaliza hacia un nivel basal de toxicidad (por ejemplo, un nivel que está asociado con la falta de una tormenta de citocinas o un nivel reducido de una tormenta de citocinas). Por ejemplo, después de reducir la cantidad de la hormona o análogo de la hormona administrada al sujeto en el paso (e), la toxicidad puede normalizarse a un nivel que sea menos de 10 veces mayor, 9 veces mayor, 8 veces mayor, 7 veces mayor, 6 veces mayor, 5 veces mayor, 4 veces mayor, 3 veces mayor, 2 veces mayor o menor que el nivel basal de toxicidad.
- En algunas formas de realización, un sujeto puede ser tratado administrándole una célula de mamífero (por ejemplo, una célula T) que incluye un polipéptido quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos de cadena única descritos en este documento), un receptor de antígeno quimérico de cadena única (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quimérico de cadena única descritos en este documento) y/o un receptor de antígeno quimérico multicable (por ejemplo, cualquiera de los receptores de antígeno quiméricos multicable descritos en este documento) que tiene un LBD y una hormona o análogo de hormona que se une al LBD. El nivel de toxicidad en el sujeto se puede controlar y la toxicidad se puede reducir mediante cualquiera de los métodos descritos en este documento, por ejemplo, reduciendo el nivel de la hormona o análogo de la hormona. Una vez que se ha reducido la toxicidad (por ejemplo, a un nivel basal o a un nivel por encima del nivel basal que sea suficientemente bajo), el nivel de la hormona o del análogo hormonal se puede aumentar posteriormente para aumentar la eficacia del tratamiento. En algunas formas de realización, el nivel de la hormona o análogo de la hormona se reduce y posteriormente se aumenta varias veces para controlar la toxicidad mientras se sigue proporcionando un tratamiento eficaz. En algunas formas de realización, el nivel de la hormona se incrementa posteriormente al 100 % del nivel en el que se administró originalmente la hormona o el análogo de la hormona. En algunas formas de realización, el nivel de la hormona o análogo de hormona se aumenta posteriormente a un nivel que es al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % del nivel en el que se administró originalmente la hormona o análogo de hormona. En algunas formas de realización, el nivel de la hormona o análogo de la hormona se aumenta posteriormente a un nivel que es más alto que el nivel en el que se administró originalmente la hormona o análogo de la hormona. Por ejemplo, la hormona o el análogo hormonal administrado posteriormente se puede administrar a un nivel que sea al menos 100 %, al menos 110 %, al menos 120 %, al menos 130 %, al menos 140 %, al menos 150 %, al menos 160 %, al menos 170 %, al menos 180 %, al menos 190 %, al menos 200 %, al menos 300 %, al menos 400 % o al menos 500 % del nivel al que se administró originalmente la hormona o el análogo hormonal.
- En algunas formas de realización, la toxicidad que surge después de administrar una primera hormona o análogo hormonal a un sujeto se puede reducir administrando una segunda hormona o análogo hormonal al sujeto. Por ejemplo, la segunda hormona o análogo de hormona puede tener una afinidad reducida por el LBD presente en el polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única y/o el receptor de antígeno quimérico multicable, de modo que la localización en la membrana plasmática del polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única y/o el receptor de antígeno quimérico multicable se reduce en comparación con la localización en la membrana plasmática facilitada por la primera hormona o análogo de hormona. En algunas formas de realización, la segunda hormona o análogo hormonal puede ser menos eficaz que la primera hormona o análogo hormonal para facilitar la localización en la membrana plasmática del polipéptido quimérico de cadena única, el receptor de antígeno quimérico de cadena única y/o el receptor de antígeno quimérico multicable. En algunas formas de realización, la segunda hormona o análogo hormonal compite con la primera hormona o análogo hormonal para unirse al LBD.

En algunas formas de realización, además de o como alternativa a la reducción del nivel de hormona o análogo de hormona para reducir la toxicidad, la toxicidad se puede reducir aún más administrando una composición que inactiva o secuestra la hormona o análogo de hormona. Por ejemplo, se puede administrar LBD exógeno al sujeto (por ejemplo, como una formulación farmacéuticamente aceptable) para secuestrar la hormona o el análogo de la hormona que se administró previamente al sujeto. Como otro ejemplo, se puede administrar al sujeto una composición que inactiva, degrada o secuestra de otro modo la hormona administrada o el análogo de la hormona. Un ejemplo no limitante de dicha composición es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la hormona administrada o al análogo de hormona y lo vuelve incapaz de penetrar una membrana celular, lo vuelve incapaz de unirse al LBD o facilita su degradación.

EJEMPLOS

La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 - Generación de construcciones

Se modificó un receptor de antígeno quimérico canónico ("CAR canónico", Figura 1, izquierda) para incluir el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno alfa ("ERa") ("Era-LBD", en verde e indicado por flechas) en varias ubicaciones dentro de la proteína. El ERa-LBD se introdujo en diferentes posiciones en el CAR (Figura 1, derecha) para crear diferentes versiones del ERa-LBD, denominadas como: "v.2" (también denominada como "v2" o "V2"), "v.3" (también denominada como "v3" o "V3") y "v.4" (también denominada como "v4" o "V4"). También se incluyó una fusión mCherry para permitir el seguimiento de las células que contienen la proteína diseñada. Las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos de v.2 (SEQ ID NO: 30 y 31, respectivamente), v.3 (SEQ ID NO: 32 y 33, respectivamente) y v.4 (SEQ ID NO: 34 y 35, respectivamente) se describen a continuación.

10 **SEQ ID NO: 30**

ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGC
CGCTAGACCTGAGCAGAAGCTGATCTCCGAAGAGGACCTGGACATCCAGATG
ACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCA
15 GCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGA
AACCCGACGGCACCCTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAG
CGGCGTGCCCGAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTG
ACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCAGCAAG
20 GCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGACCAAGCTGGAAATCACAGG
CGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGAAGTGGCGGAGGGGGATCTGAAGTGAA
ACTGCAGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTG
ACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCCTGACTATGGCGTGTCTGGATCAG
ACAGCCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCCAGCGA
25 GACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGAC
AACTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACA
CCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCAT
GGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCTAGCACAACCACCCCT
GCCCCTAGACCTCCAACCCAGCCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCT
GAGGCCCGAGGCTTGTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGG
30 ACTGGATTTGCTGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACATGTG
GCGTGCTGCTGCTGAGCCTCGTGATCACCTGTACTGCGGATCCAAGCGGGG
CAGAAAGAACTGCTGTACATCTTTAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAG
ACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGCAGATTCCCCGAGGAAGAAGAA
GGCGGCTGCGAGCTGGGCAGCGGATCTGGCAGTGGAAGCGATAGAAGAGGC
35 CGAGAATGCTGAAACACAAGCGGCAGAGGGACGACGGGGAAGGCAGAGG
CGAAGTGGGATGTCGGCGGATATGAGAGCCGCCAACCTGTGGCCTAGCCCC
CTGATGATCAAGCGGAGCAAGAAGAACTCCCTGGCCCTGAGCCTGACCGCCG
ACCAGATGGTGTCTGCCCTGCTGGATGCCGAGCCCCCATCTGTACAGCGA
GTACGACCCACACAGACCCTTCAGCGAGGCCAGCATGATGGGCCTGCTGACC
40 AACCTGGCCGACCGGGAAGTGGTGACATGATCAACTGGGCCAAGCGGGTGC
CCGGCTTCGTGGATCTGACACTGCACGACCAGGTGCACCTGCTGGAATGCGC
TTGGCTGGAATCTGTATGCTCGGCCTCGTGTGGCGGAGCATGGAACACCCT
GCGAAGCTGCTGTGTCGCCCAACCTGCTGCTGGACCGGAACCAGGGCAAAT
GCGTGGAAGGCATGGTGAAATCTTCGACATGCTGCTGGCCACCTCCAGCCG
45 GTTCCGGATGATGAACCTGCAGGGCGAAGAGTTCTGTCTGAAGTCCATC
ATCCTGCTGAATAGCGCGTGTACACCTTCCTGAGCAGCACCTGAAAAGCC
TGGAAGAAAAGGACCACATCCACCGGGTGTGGACAAGATCACCGACACCC
TGATTACCTGATGGCCAAGGCCGACTGACCCTGCAGCAGCAGCATCAGAG
ACTTGGCTCAGCTGCTGCTGATCCTGTCCACATCCGGCACATGAGCAACAAG
50 CGGATGGAACATCTGTACAGCATGAAGTGCAAGAACGTGGTGCCTCTGTTCTG
ATCTGCTGCTGGAATGCTGGACGCCACAGGCTGCACGCCCAACATCCAG
ATCCGGATCTGGAAGTGGCTCCCTGAGAGTGAAGTTTAGCAGAAGCGCCGAC
GCCCCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGG
GCAGGCGGGAAGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGCGGGGACGGGACCCCTG
55 AAATGGGCGGCAACCCAGACGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTACAACG
AACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGAATGAAGG
GCGAGCGCGGAGAGGACGAGGACATGATGGCCTGTACCAGGGCCTGTCCA
CCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAG
AGGAAGTGGATCTGGGAGCGGCTCTATGGTGTCTAAGGGGGAAGAGGACAA
60 CATGGCCATCATCAAGAATTCATGCGGTTCAAGGTGCACATGGAAGGCTCC
GTGAATGGCCACGAATTCGAGATCGAGGGGGAGGGCGAGGGCAGACCTTAT
GAGGGAACCCAGACCGCCAAGCTGAAAGTGACCAAGGGCGGACCCCTGCCT
TTCGCTGGGATATCCTGTCTCCCCAGTTTATGTACGGCAGCAAGGCCTACGT
GAAGCACCCCGCCGACACTCCCCGACTACCTGAAGCTGAGCTTCCCTGAGGGC
65 TTCAAGTGGGAGAGAGTGATGAATTTTCGAGGACGGCGGAGTCTGACAGTGA
CCCAGGATAGCTCTCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAAGTGAAGCTGCG

GGGCACCAACTTCCCCAGCGACGGACCCGTGATGCAGAAAAAGACCATGGG
 CTGGGAGGCCAGCTCCGAGAGAATGTACCCAGAGGACGGGGCCCTGAAGGG
 GGAGATCAAGCAGCGGCTGAAACTGAAGGATGGCGGCCACTACGACGCAGA
 AGTGA AAACACCTACAAGGCCAAGAAACCTGTGCAGCTGCCTGGCGCCTAC
 5 AATGTGAACATCAAGCTGGACATTACCAGCCACAACGAGGACTACACCATCG
 TGGAACAGTACGAGCGGGCCGAGGGCAGGCATTCTACAGGCGGAATGGATG
 AACTGTATAAGTGCGTGACCGACTAG

SEQ ID NO: 31

10 MALPVTALLPLALLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRA
 SQDISKYLNWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE
 DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVA
 PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI
 IIKDNSKSDQVFLKMNSLQTD DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSST
 15 TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG
 VLLLSLVITLYCGSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCEL
 GSGSGSGSDRRGGRMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMRAANLWPSPLMIKRS
 KKNLSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADREL
 HMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLECAWLEILMIGLVWRSMHEPGKLLFAPNL
 20 LLDRNQKGCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLS
 STLKSLEEKDHIHRVLDKITD LLIHLMAKAGLTQQQHQRLAQLLLILSHIRHMSN
 KRMEHLYSMKCKNVVPLFDLLEMLDAHRLHAPTSRSGSGSGSLRVKFSRSADA
 PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRS
 25 GSGSGSMVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQT
 AKLKVTGKGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVM
 NFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERM
 YPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSH
 NEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKCVTD

SEQ ID NO: 32

ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGC
 CGCTAGACCTGAGCAGAAGCTGATCTCCGAAGAGGACCTGGACATCCAGATG
 ACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCA
 35 GCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAA
 ACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGACTGCACAGC
 GCGCTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGA
 CCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCAGCAAGGC
 AACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACAGGCG
 40 GCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGAAGTGGCGGAGGGGGATCTGAAGTGAAAC
 TGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGAC
 CTGTACCGTGTCGGGCTGTCCCTGCCTGACTATGGCGTGTCTGGATCAGAC
 AGCCCCCAGAAAGGGCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGAC
 AACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACT
 45 CCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGC
 CATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACT
 ACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCTAGCACAAACCACCCCTGCCCC
 TAGACCTCCAACCCAGCCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGC
 CCGAGGCTTGTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGA
 50 TTTGCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCGTGCT
 GCTGCTGAGCCTCGTGATCACCTGTACTGCGGATCCAAGCGGGGCAGAAAG
 AAAGTGTGTACATCTTTAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGACAGCACCCA
 GGAAGAGGACGGCTGCTCCTGCAGATTCCCCGAGGAAGAAGAAGGCGGCTG
 CGAGCTGAGATCCGGATCTGGAAGTGGCTCCCTGAGAGTGAGTTTAGCAGA
 55 AGCGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGC
 TGAACCTGGGCAGGCGGGAAGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGCGGGGCA
 GGGACCCCTGAAATGGCGGCAAAACCCAGACGGAAGAACCCCAAGGAAGGCC
 TGTACAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGG
 AATGAAGGGCGAGCGGCGGAGAGGCAAGGGACATGATGGCCTGTACCAGGG
 60 CCTGTCCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC
 CTCCAAGAGGCAGCGGATCTGGCAGTGGAAGCGATAGAAGAGGCGGCAGAA
 GCTGAAACACAAGCGGCAGAGGGACGACGGGGAAGGCAGAGGCGAAGTGG
 GATCTGCCGGCGATATGAGAGCCGCCAACCTGTGGCCTAGCCCCCTGATGATC
 AAGCGGAGCAGGAAGAACTCCCTGGCCCTGAGCCTGACCGCCGACCAGATGG
 65 TGTCTGCCCTGCTGGATGCCGAGCCCCCATCTGTACAGCGAGTACGACCCC
 ACCAGACCCCTTCAGCGAGGCCAGCATGATGGGCCTGCTGACCAACCTGGCCG

ACCGGGAACTGGTGCACATGATCAACTGGGCCAAGCGGGTGCCCGGCTTCGT
 GGATCTGACACTGCACGACCAGGTGCACCTGCTGGAATGCGCTTGGCTGGAA
 ATCCTGATGATCGGCCCTCGTGTGGCGGAGCATGGAACACCCTGGCAAGCTGCT
 GTTCGCCCCCAACCTGCTGCTGGACCGGAACCAGGGCAAATGCGTGGAAGGC
 5 ATGGTGGAATCTTCGACATGCTGCTGGCCACCTCCAGCCGGTTCGGATGAT
 GAACCTGCAGGGCGAAGAGTTCGTGTGTCTGAAGTCCATCATCCTGCTGAATA
 GCGGCGTGTACACCTTCCTGAGCAGCACCCCTGAAAAGCCTGGAAGAAAAGGA
 CCACATCCACCGGGTGTGGACAAGATCACCGACACCCTGATTACCTGATGG
 CCAAGGCCGGAAGTACCCTGCAGCAGCAGCATCAGAGACTGGCTCAGCTGCT
 10 GCTGATCCTGTCCCACATCCGGCACATGAGCAACAAGCGGATGGAACATCTGT
 ACAGCATGAAGTGCAAGAACGTGGTGCCTCTGTTCGATCTGCTGCTGGAATG
 CTGGACGCCCCACAGGCTGCACGCCCCAACATCCGGATCTGGCTCTGGAAGCG
 GCAGCATGGTGTCTAAGGGGGGAAGAGGACAACATGGCCATCATCAAAGAATT
 CATGCGGTTCAAGGTGCATGGAAGGCTCCGTGAATGGCCACGAATTCGAGA
 15 TCAGGGGGGAGGGCGAGGGCAGACCTTATGAGGGAACCCAGACCGCCAAGC
 TGAAAGTGACCAAGGGCGGACCCCTGCCTTTCGCTGGGATATCCTGTCTCCC
 CAGTTTATGTACGGCAGCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGA
 CTACCTGAAGCTGAGCTTCCCTGAGGGCTTCAAGTGGGAGAGAGTGATGAATT
 TCGAGGACGGCGGAGTCTGTGACAGTGACCCAGGATAGCTCTCTGCAGGACGG
 20 CGAGTTCATCTACAAAGTGAAGCTGCGGGGCACCAACTTCCCCAGCGACGGA
 CCCGTGATGCAGAAAAAGACCATGGGCTGGGAGGCCAGCTCCGAGAGAATGT
 ACCCAGAGGACGGGGCCCTGAAGGGGGAGATCAAGCAGCGGCTGAAACTGA
 AGGATGGCGGCCACTACGACGCAGAAGGTGAAAACCACTACAAGGCCAAGA
 AACCTGTGCAGCTGCCTGGCGCCTAAATGTGAACATCAAGCTGGACATTACC
 25 AGCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAGCGGGCCGAGGGC
 AGGCATTCTACAGCGGAATGGATGAACTGTATAAGTGCCTGACCGACTAG

SEQ ID NO: 33

MALPVTALLPLALLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSSLASLGDRVITISCR
 30 SQDISKYNWYQKPKDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE
 DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAP
 SQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTII
 KDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSTTT
 PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
 35 LSLVITLYCGSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRS
 GSGSLRVKFSRDAKPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT
 YDALHMQALPPRSGSGSGSDRRGGRMLKHQRDDGEGRGEVGSAGDMRAA
 NLWPSPLMIKRSKKNLSLADQMVSAALLDAEPPILYSEYDPTPRPFSEASMMG
 40 LLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLECAWLEILMIGLVWRSMEH
 PGKLLFAPNLLDRNQKCVGEVMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIIL
 LNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTQQQHQLAQLL
 LILSHIRHMSNKRMEHLISMKCKNVVPLFDLLLEMLDAHRLHAPTSGSGSGSGS
 MVSKEEDNMAIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVT
 45 KGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGG
 VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGA
 LKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTI
 VEQYERAEGRHSTGGMDELYKCVTD

SEQ ID NO: 34

ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGC
 CGCTAGACCTGAGCAGAAGCTGATCTCCGAAGAGGACCTGGACATCCAGATG
 ACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCA
 GCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAA
 55 ACCCGACGGCACCCTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGC
 GGCCTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGA
 CCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTGACGAAGGC
 AACACCCTGCCCCCTACACCTTCGGCGGAGGACCAAGCTGGAATCACAGGCG
 GCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGAAGTGGCGGAGGGGGATCTGAAGTGAAAC
 60 TGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGAC
 CTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATGGCGTGTCTGGATCAGAC
 AGCCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGAC
 AACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACT
 CCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGTGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGC
 65 CATCTACTACTCGCCCAAGCTACTACTACGGCGGCGAGCTACGCCATGGACT
 ACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCTAGCACAAACCACCCCTGCCCC

TAGACCTCCAACCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGC
 CCGAGGCTTGTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGA
 TTTGCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCGTGCT
 GCTGCTGAGCCTCGTGATCACCTGTACTGCGGATCCGGCAGCGGATCTGGCA
 5 GTGGAAGCGATAGAAGAGGCGGCAGAATGCTGAAACACAAGCGGCAGAGGG
 ACGACGGGGAAGGCAGAGGGCGAAGTGGGATCTGCCGGCGATATGAGAGCCGC
 CAACCTGTGGCCTAGCCCCCTGATGATCAAGCGGAGCAAGAAGAACTCCCTG
 GCCCCCTGAGCCTGACCGCCGACCAGATGGTGTCTGCCCTGCTGGATGCCGAGCC
 CCCCATCCTGTACAGCGAGTACGACCCACCAGACCCTTCAGCGAGGCCAGCA
 10 TGATGGGCCTGCTGACCAACCTGGCCGACCGGGAACCTGGTGCACATGATCAA
 CTGGGCCAAGCGGGTGGCCGGCTTCGTGGATCTGACACTGCACGACCAGGTG
 CACCTGCTGGAATGCGCTTGGCTGGAATCCTGATGATCGGCCTCGTGTGGCG
 GAGCATGGAACACCCTGGCAAGCTGCTGTTGCCCCCAACCTGCTGCTGGAC
 CGGAACCAAGGCAAAATGCGTGAAGGCATGGTGAATCTTCGACATGCTGC
 15 TGGCCACCTCCAGCCGGTTCGGATGATGAACCTGCAGGGCGAAGAGTTCGT
 GTGTCTGAAGTCCATCATCTGCTGAATAGCGGCGTGTACACCTTCCTGAGCA
 GCACCCTGAAAAGCCTGGAAGAAAAGGACCACATCCACCGGGTGTGGACA
 AGATCACCGACACCCTGATTACCTGATGGCCAAGGCCGACTGACCCTGCA
 GCAGCAGCATCAGAGACTGGCTCAGCTGCTGCTGATCCTGTCCCACATCCGGC
 20 ACATGAGCAACAAGCGGATGGAACATCTGTACAGCATGAAGTGAAGAAGCT
 GGTGCTCTGTTGATCTGCTGGAATGCTGGACGCCACAGGCTGCACG
 CCCCACATCCGGATCTGGCTCTGGAAGCGGCAGCAAGCGGGGCAGAAAGAA
 ACTGCTTACATCTTTAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGG
 AAGAGGACGGCTGCTCCTGCAGATTCCCCGAGGAAGAAGAAGGCGGCTGCG
 25 AGCTGAGATCCGGATCTGGAAGTGGCTCCCTGAGAGTGAAGTTTAGCAGAAG
 CGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTG
 AACCTGGGCAGGCGGGAAGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGCGGGGCAGG
 GACCCTGAAATGGCGGGCAAAACCCAGACGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTG
 TACAACGAATGCAGAAAAGACAAGATGGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGAA
 30 TGAAGGGCGAGCGGCGGAGAGGCAAGGGACATGATGGCCTGTACCAGGGCCT
 GTCCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTC
 CAAGAGGAAGTGGATCTGGGAGCGGCTCTATGGTGTCTAAGGGGGAAGAGGA
 CAACATGGCCATCATCAAAGAATTCATGCGGTTCAAGGTGCACATGGAAGGCT
 CCGTGAATGGCCACGAATTCGAGATCGAGGGGGAGGGCGAGGGCAGACCTTA
 35 TGAGGGAAACCCAGACCCCAAGCTGAAAGTGACCAAGGGCGGACCCCTGCC
 TTTGCGCTGGGATACCTGCTCTCCCCAGTTTATGTACGGCAGCAAGGCCCTACGT
 GAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACCTGAAGCTGAGCTTCCCTGAGGGC
 TTCAAGTGGGAGAGAGTGATGAATTTGAGGACGGCGGAGTCGTGACAGTGA
 CCCAGGATAGCTCTCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAAGTGAAGCTGCG
 40 GGGCACCAACTTCCCCAGCGACGGACCCGTGATGCAGAAAAAGACCATGGGC
 TGGGAGGCCAGCTCCGAGAGAATGTACCCAGAGGACGGGGCCCTGAAGGGG
 GAGATCAAGCAGCGGCTGAAACTGAAGGATGGCGGCCACTACGACGCAGAA
 GTGAAAAACCACTACAAGGCCAAGAAACCTGTGCAGCTGCCTGGCGCCTACA
 ATGTGAACATCAAGCTGGCATTACCAGCCACAACGAGGACTACACCATCGTG
 45 GAACAGTACGAGCGGGCCGAGGGCAGGCATTCTACAGCGGAATGGATGAAC
 TGTATAAGTGCCTGACCGACTA

SEQ ID NO: 35

MALPVTALLPLALLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCR
 50 SQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE
 DIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAP
 SQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTII
 KDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSTTT
 PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL
 55 LSLVITLYCGSGSGSGSDRRGGRMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMRAANL
 WPSPLMIKRSKKNLSLADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTPFSEASMMGLLT
 NLADRELHMINWAKRVPFVDLTLDHDLVHLECAWLEILMIGLVWRSMEHPG
 KLLFAPNLLDRNQKCGVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLN
 SGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMKAGLTQQQHQRQAQLLLLIL
 60 SHIRHMSNKRMEHLYSMKCKNVVPLFDLLEMLDAHRLHAPTSGSGSGSGSKRG
 RKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPFFFFFFGCELRSGSGSGSLRVKFSRSA
 DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNE
 LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRG
 SSGSGSMVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQT
 65 AKLVTKGGPLPFAWDILSPQFMYSKAYVKHPADIPDYKLKLSFPEGFKWERVM
 NFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERM

YPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSH
NEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKCVTD

Ejemplo 2: Los receptores de antígenos quiméricos anti-CD19 que contienen NHR-LBD exhiben expresión superficial inducida por ligando del CAR.

Las células T Jurkat se transdujeron con vectores lentivirales que codifican el CAR canónico o con anti-CD19 (FMC63) ERa-LBD que contiene las construcciones CAR v2, v3 y v4 descritas en el Ejemplo 1. A continuación, las células se dejaron sin tratar o se trataron con un ligando para el ERa-LBD. Después de una hora de tratamiento farmacológico, las células se tiñeron con proteína L-biotina (la proteína L se une al scFv extracelular) y luego con estreptavidina BV421 para detectar la expresión superficial del CAR. Las células fueron analizadas posteriormente mediante citometría de flujo para la expresión de mCherry y la presencia de CAR en la superficie celular (Figura 2A). El CAR canónico se expresó en la superficie en niveles idénticos independientemente de la presencia o ausencia del fármaco (Figura 2A, gráficos de puntos bajo el título "CAR canónico"). Por el contrario, los CAR v2 y v4 que contienen ERa-LBD (receptores de antígenos quiméricos de cadena única ejemplares descritos en este documento) se expresan en presencia del ligando (como se analiza por expresión positiva de mCherry), pero en ausencia del ligando, no se detecta ningún CAR en la superficie celular (Figura 2A, fila superior, tinción de proteína L, diagramas de puntos bajo los encabezados "v2" y "v4"). Después del tratamiento con 500 ng/mL de 4-OHT, se detecta CAR en la superficie celular (Figura 2A, fila inferior, tinción de proteína L) en niveles comparables al CAR de control. Cabe destacar que no todos los diseños se comportan de manera idéntica: v3 tiene cierta expresión superficial basal de CAR en ausencia de ligando (Figura 2A, diagrama de puntos superior bajo el encabezado "v3"), y la expresión aumenta aún más tras la adición de ligando (Figura 2A, diagrama de puntos inferior bajo el encabezado "v3").

Las células T humanas CD4 y CD5 primarias se transdujeron con vectores lentivirales que codifican las construcciones CAR v4. Las células se trataron como se describe en este ejemplo y se tiñeron utilizando un anticuerpo anti-cMyc para detectar el scFv marcado con cMyc en la superficie celular. Se observó inducción de superficie tanto en células T CD4 como CD5 después del cocultivo de las células T con 500 ng/mL de ligando 4-OHT (Figura 2B), lo que demuestra que el fenotipo de inducción de superficie se extiende desde Jurkat hasta las células T humanas primarias.

Ejemplo 3: Las proteínas de fusión NHR-LBD exhiben expresión de superficie inducida por ligando en diversos tipos de células

Las células HEK-293T se transdujeron con vectores lentivirales que codifican ERa-LBD que contienen fusiones FMC63 CAR descritas en el Ejemplo 1. Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con 500 ng/mL de 4-OHT durante dos horas y luego se tiñeron para la expresión de CAR en la superficie. En consonancia con los resultados de LBD de ERa en células Jurkat y células T primarias demostrados en el Ejemplo 2, varias fusiones de CAR ERa-LBD exhibieron una expresión superficial mínima de CAR en ausencia de ligando y una fuerte regulación positiva de CAR superficial tras el tratamiento con ligando (Figura 3). Estos datos indican que la expresión superficial inducida por ligando de las fusiones de CAR NHR-LBD opera en diversos tipos de células, incluidas las células inmortalizadas (Jurkat y HEK-293T) y primarias (células T CD4 y CD5 humanas), así como en tipos de células linfoides (Jurkat y T humanas) y no linfoides (HEK-293T).

Ejemplo 4 - La expresión superficial inducida por ligando de fusiones NHR LBD-CAR se conserva entre diferentes scFv

Para demostrar la función conservada y la modularidad de las proteínas de fusión NHR LBD-CAR, el scFv FMC63 en V4 se reemplazó con un scFv diferente (J6M0) que reconoce el antígeno de maduración de células B ("BCMA"). Las células T CD4 humanas primarias se transdujeron con vectores lentivirales que codifican las fusiones CAR NHR-LBD y se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL del ligando ERa 4-OHT. De manera similar a las fusiones FMC63 NHR LBD-CAR, el NHR LBD-CAR que tiene el scFv J6M0 mostró expresión de superficie inducida por ligando (Figura 4)

Ejemplo 5: El tráfico de superficie inducido por ligando de las proteínas de fusión NHR LBD no requiere scFv ni dominios intracelulares del CAR canónico

Las fusiones LBD-CAR analizadas en el Ejemplo 2 contienen varios motivos proteicos además del dominio LBD de NHR, incluido un dominio intracelular CD137, un dominio de señalización intracelular CD3z y un dominio scFv. Para determinar si las porciones intracelulares de las construcciones CAR (el dominio intracelular CD137 y el dominio intracelular CD3z) estaban involucradas en el tráfico de superficie inducido por ligando, se generó una construcción que carecía de estas regiones ("v5", Figura 5A, izquierda) y se probó en células T humanas primarias. La construcción v5 incluye el dominio scFv y el dominio mCherry. El constructo v5 exhibió un tráfico inducido por ligando comparable al de los constructos v2 y v4 en el Ejemplo 2, lo que indica que los motivos intracelulares CAR no fueron responsables del tráfico inducido por ligando (Figura 5A, derecha). La secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 36) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 37) de v5 se muestran a continuación.

SEQ ID NO: 36

ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGC
CGCTAGACCTGAGCAGAAGCTGATCTCCGAAGAGGACCTGGACATCCAGATG
ACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCA

5 GCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAA
 ACCCGACGGCACCCTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGC
 GCGGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCAGCTACAGCCTGA
 CCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCAGCAAGGC
 AACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGACCAAGCTGGAAATCACAGGCG
 GCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGAAGTGGCGGAGGGGGATCTGAAGTGAAAC
 TGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGAC
 CTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATGGCGTGTCTGGATCAGAC
 AGCCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGAC
 10 AACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCATCAAGGACAAC
 CCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGC
 CATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACT
 ACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCTAGCACAACCACCCCTGCCCC
 TAGACTCCAACCCAGCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGC
 15 CCGAGGCTTGACAGCGAGTACGACCCACCCACAGACCCCTTCAGCGAGGCCAGCA
 TTTGCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCGTGCT
 GCTGCTGAGCCTCGTGATCACCTGTACTGCGGATCCGGCAGCGGATCTGGCA
 GTGGAAGCGATAGAAGAGGCGGCAGAATGCTGAAACACAAGCGGCAGAGGG
 ACGACGGGGAAGGCAGAGGCGAAGTGGGATCTGCCGGCGATATGAGAGCCGC
 20 CAACCTGTGGCCTAGCCCCCTGATGATCAAGCGGAGCAAGAAGAACTCCCTG
 GCCCTGAGCCTGACCGCCGACCAGATGGTGTCTGCCCTGCTGGATGCCGAGCC
 CCCCATCCTGTACAGCGAGTACGACCCACCCACAGACCCCTTCAGCGAGGCCAGCA
 TGATGGGCCTGTGACCAACCTGGCCGACCGGGAAGTGGTGACATGATCAA
 CTGGGCCAAGCGGGTGCCCGGCTTCGTGGATCTGACACTGCACGACCAGGTG
 25 CACCTGCTGGAATGCGCTTGGCTGGAAATCCTGATGATCGGCCTCGTGTGGCG
 GAGCATGGAACACCCTGGCAAGCTGCTGTTGCCCCCAACCTGCTGCTGGAC
 CGGAACCAGGGCAAATGCGTGGAAGGCATGGTGGAAATCTTCGACATGCTGC
 TGCCACCTCCAGCCGGTTCGGGATGATGAACCTGCAGGGCGAAGAGTTCGT
 GTGTCTGAAGTCCATCATCCTGCTGAATAGCGGCGTGTACACCTTCCTGAGCA
 30 GCACCCTGAAAAGCCTGGAAGAAAAGGACCACATCCACCGGGTGTGGACA
 AGATCACCGACACCCTGATTCACCTGATGGCCAAGGCCGGAAGTACCTGCA
 GCAGCAGCATCAGAGACTGGCTCAGCTGCTGCTGATCCTGTCCACATCCGGC
 ACATGAGCAACAAGCGGATGGAACATCTGTACAGCATGAAGTGCAAGAACGT
 GGTGCCTCTGTTGATCTGCTGCTGGAAATGCTGGACGCCACAGGCTGCACG
 35 CCCCACATCCGGATCTGGCTCTGGAAGCGGCAGCATGGTGTCTAAGGGGGA
 AGAGGACAACATGGCCATCAAAGAATTATGCGGTTCAAGGTGCACATGG
 AAGGCTCCGTGAATGGCCACGAATTCGAGATCGAGGGGGAGGGCGAGGGCA
 GACCTTATGAGGGAAACCCAGACCGCCAAGCTGAAAGTGACCAAGGGCGGACC
 CCTGCCCTTTCGCTGGGATATCCTGTCTCCCCAGTTTATGTACGGCAGCAAGGC
 40 CTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACCTGAAGCTGAGCTTCCCTG
 AGGGCTTCAAGTGGGAGAGAGTGATGAATTTGAGGACGGCGGAGTCTGAC
 AGTGACCCAGGATAGCTCTCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAAGTGAAG
 CTGCGGGGCACCAACTTCCCCAGCGACGGACCCGTGATGCAGAAAAAGACCA
 TGGGCTGGGAGGCCAGCTCCGAGAGAATGTACCCAGAGGACGGGGCCCTGAA
 45 GGGGGAGATCAAGCAGCGGCTGAAACTGAAGGATGGCGGCCACTACGACGC
 AGAAGTGAAAACCACTACAAGGCCAAGAAACCTGTGCAGCTGCCTGGCGCC
 TACAATGTGAACATCAAGCTGGACATTACCAGCCACAACGAGGACTACACCAT
 CGTGGAACAGTACGAGCGGGCCGAGGGCAGGCATTCTACAGGCGGAATGGAT
 50 GAACTGTATAAGTGCGTGACCGACTAG

SEQ ID NO: 37

MALPVTALLPLALLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRA
 SQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE
 DIATQFQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAP
 55 SQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTII
 KDNSKSQVFLKMNSLQTDDAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSTTT
 PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
 LSLVITLYCGSGSGSGSDRRGGRMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMRAANL
 WPSPLMIKRSKKNSLALSADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLT
 60 NLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLCAWLEILMIGLVWRSMEHPG
 KLLFAPNLLLDRNQKCVGEVMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLN
 SGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAGGLTLQQQHQLAQLLLIL
 SHIRHMSNKRMEHLYSMKCKNVVPLFDLLEMLDAHRLHAPTSGSGSGSGSMV
 SKGEEDNMIIKEFMRFKVMHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQAKLKVTKG
 65 GPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVV

TVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALK
GEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYITVE
QYERAEGRHSTGGMDELYKCVTD

5 Para probar si el scFv extracelular estaba involucrado en la expresión de superficie inducida por ligando generó construcciones que carecían del scFv; en su lugar se insertó una etiqueta FLAG para permitir la detección de la superficie de la proteína (las secuencias de ácido nucleico y polipéptido para esta construcción se muestran a continuación como SEQ ID NO: 38 y 39, respectivamente). Las células T Jurkat se transdujeron con un vector lentiviral que codifica la proteína de fusión ERA-LBD y se tiñeron para la expresión superficial del polipéptido en presencia y ausencia del ligando ERa 4-OHT. El tratamiento con ligando indujo una detección robusta de la superficie del polipéptido (Figura 5B), lo que indica que la expresión de la superficie mediada por NHR-LBD no requiere un scFv y que la tecnología es ampliamente generalizable a diversos polipéptidos.

SFQ ID NO: 38

15 ATGATCCACCTGGGACACATCCTGTTTTGCTGCTGCTGCCAGTGGCTGCCGC
CgattacaaagacgacgatgataaaCAGACAACACCAGGCGAGAGATCTAGCCTGCCCGCC
TTCTACCCTGGCACCAGCGGCTCTTGTTCTGGCTGTGGCAGCCTGTCTCTGCC
CatctatatttgggcacccctggtctggaacctgcggagtgtctgtctgtctctctgtattacactgtattgcAAAAGGGG
CCGAAAAAAGCTGCTGTATATTTTCAAACAGCCTTTTATGAGGCCTGTGCAGA
20 CAACACAGGAAGAGGACGGCTGTAGCTGTCGGTTCCTCCCGAAGGAGGAAGG
GGGGCTGCGAACTGggatcaggcagtggtctgtgcagcGATAGAAGAGGCGCGAGAATGC
TGAAACACAAGCGGCAGAGGGACGACGGGAAGGCAGAGGCGAAGTGGGAT
CTGCCGGCGATATGAGAGCCGCCAACCTGTGGCCTAGCCCCCTGATGATCAAG
CGGAGCAAGAAGAACTCCCTGGCCCTGAGCCTGACCGCCGACCAGATGGTGT
25 CTGCCCTGCTGGATGCCGAGCCCCCATCCTGTACAGCGAGTACGACCCCCACC
AGACCCTTCAGCGAGGCCAGCATGATGGCCCTGCTGACCAACCTGGCCGACC
GGGAACCTGGTGCACATGATCAACTGGGCCAAGCGGGTGCCCGGCTTCGTGGA
TCTGACACTGCACGACCAGGTGCACCTGCTGGAATGCGCTTGCTGGAATCC
TGATGATCGGCCTCGTGTGGCGGAGCATGGAACACCCTGGCAAGCTGCTGTTT
30 GCCCCCAACCTGCTGCTGGACCGGAACCAGGGCAAATGCGTGGAAGGCATGG
TGGAATCTTCGACATGCTGCTGGCCACCTCCAGCCGGTTCGGGATGATGAAC
CTGCAGGGCGAAGAGTTCTGTGTGTCTGAAGTCCATCATCCTGCTGAATAGCGG
CGTGTACACCTTCTGAGCAGCACCTGAAAAGCCTGGAAGAAAAGGACCAC
ATCCACCGGGTGCTGGACAAGATCACCGACACCCTGATTACCTGATGGCCAA
35 GGCCGGACTGACCCTGCAGCAGCAGCATCAGAGACTGGCTCAGCTGCTGCTG
ATCCTGTCCACATCCGGCACATGAGCAACAAGCGGATGGAACATCTGTACAG
CATGAAGTGCAAGAACGTGGTGCCTCTGTTTGATCTGCTGCTGGAATGCTGG
ACGCCCCACAGGCTGCACGCCCAACATCCaGATCCg gatctggaagtgggtcccTGAGA
GTGAAGTTTAGCAAGCGCCGACGCCCTGCTATCAGCAGGGACAGAGA
40 AGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGCGGGAAGTACGACGTGCTGGA
TAAGAGGCGGGGCAGGGACCTGAAATGGGCGGCAAACCCAGACGGAAGAA
CCCCCAGGAAGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC
CTACAGCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGCGGAGAGGCAAGGGACATGAT
GGCCTGTACCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGC
45 ACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGAggaagtggatctgggagcggctctatggtgtctaagggggaagagg
acaacatggcccatcaaaagaattcatcggttcaaggtgcacatggaaggtccctgtaagtggccacgaattcagatcgagg
gggagggcgagggcagacccttatgaggaaccagaccgccaagctgaaagtgaaccaagggcgaccttccttgcct
gggatatcctgtctccccagtttatgtacggcgaggaaggcctactgtaagcaccccgccgacatccccgactacctgaagctga
gcttccctgagggctcaagttgggagagagtgtatgaattcgaggacggcggagtctgtacagtgaaccaggatagctctctgc
50 aggacggcgagttcatctacaaagtgaagctgcggggcaccacttccccagcgacggaccctgtatcgaaaaagaccat
gggctgggagggccagctccgagagaatgtaccacagaggacggggccctgaagggggagatcaagcagcggtgaaactg
aaggatgcgggccactacgacgcagaagtgaaccacactcaaggccaagaaacctgtgcagtgccttggcgctacaatg
tgaacatgagcttgacattaccagcaccacagaggactacaccatcgtggaacagtagcagaggggcccagggcaggcattc
tacaagccgaatgtaactgataaattgcctgtaaccacTAG

SEQ ID NO: 39

MIHLGHILFLLLLPVAADYKDDDDKQTTGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGLSLP
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGCELGSGSGSGSDRRGGRMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMRAANL
60 WPSPLMIKRSKKNSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLT
NLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLDHQVHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPG
KLLFAPNLLLDNRNQKCGVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNQLQGEFVCLKSIILLN
SGVYFTLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAGAGTLQQHQRLAQALLIL
SHIRHMSNKRMEHLYSMKCNVVPFLDLLLEMLDAHRLHAPTQRSGSGSGLRV
65 KFSRSADAPAYQQGQNLQYNEINLGRREEYDVLDPKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ

EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
 LPPRSGSGSGSMVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPY
 EGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKLSFPEGFKW
 ERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEAS
 5 SERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKL
 DITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKCVTD

El polipéptido de SEQ ID NO: 39 incluye los siguientes dominios: péptido señal Dap10 (MIHLGHILLLLLPVAAA, SEQ ID NO: 40), etiqueta FLAG (DYKDDDDK, SEQ ID NO: 41), dominio extracelular Dap10 (QTTTPGERSSSLPAFYPGTSGSCSGCSLSLP, SEQ ID NO: 42), dominio transmembrana CD8 (IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC, SEQ ID NO: 43), dominio coestimulador 4-1BB (KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEEGGCEL, SEQ ID NO: 44), primer enlazador (GSGSGSGS, SEQ ID NO: 45), dominio ERa modificado (DRRGGRMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLSLSTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTR PFSEASMMGLLTNLADRELHVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLDRNQG KCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDITLIHLMKAGLTLQ QQHQRALQALLILSHIRHMSNKRMEHLYSMKCKNVVPLFDLLEMLDAHRLHAPTS, SEQ ID NO: 46), segundo enlazador (RSGSGSGS, SEQ ID NO: 47), dominio de señalización CD3 zeta (LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR, SEQ ID NO: 48), tercer enlazador (GSGSGSGS, SEQ ID NO: 49), mCherry (MVSKEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYV KHPADIPDYKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMY PEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKL DITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK CVTD, SEQ ID NO: 50).

Ejemplo 6 - La expresión superficial inducida por ligando de las construcciones de fusión NHR-LBD se extiende a diferentes NHR, incluido el receptor de progesterona (PR)

Para probar si las fusiones LBD del receptor de progesterona ("PR") exhibieron expresión superficial inducida por ligando, se generó una construcción (v33) (las secuencias de ácido nucleico y polipéptido para esta construcción se muestran a continuación como SEQ ID NOs: 51 y 52, respectivamente). El constructo probado contenía una etiqueta FLAG N-terminal para detección de superficie. Las células T Jurkat se transdujeron con vectores lentivirales que codificaban el constructo y se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de mifepristona, un ligando PR. Las células se tiñeron para la expresión de proteínas de superficie después de dos horas de tratamiento con el fármaco. El constructo exhibió una expresión superficial inducida por ligando del polipéptido, detectada por citometría de flujo (Figura 6), lo que indica que otros NHR-LBD (aparte de ERa) podrían usarse para generar constructos con expresión superficial inducible por ligando, y que la expresión superficial inducida por ligando de las proteínas de fusión NHR-LBD es un fenómeno generable.

SEQ ID NO: 51

ATGATCCACCTGGGACACATCCTGTTTTGCTGCTGCTGCCAGTGGCTGCCGC
 CgattacaaagacgacgatgataaaCAGACAACACCAGGCGAGAGATCTAGCCTGCCCGCC
 TTCTACCCTGGCACCAGCGGCTCTTGTCTGGCTGTGGCAGCCTGTCTCTGCC
 CatctatatttgggcaccctggctggaacctcggagtgctgtctgtctctgtgattacactgtattgcAAAAGGGG
 CCGGAAAAAGCTGCTGTATATTTTCAAACAGCCTTTTATGAGGCCTGTGCAGA
 45 CAACACAGGAAGAGGACGGCTGTAGCTGTCTGGTTCCTCCGAAGAGGAAGAGG
 GGGGCTGCGAACTGggatcaggcagtgctgtgagcGGGCAAGACATTCAGCTCATACC
 TCCTTTGATAAATTTGCTGATGTCTATAGAACCAGATGTCATATACGCTGGTCAC
 GACAATACGAAACCGGACACATCTTCATCTTTGCTTACCTCTCTGAATCAACTG
 GGTGAACGACAGCTCCTGAGTGTTGTTAAGTGGTCTAAAAGCCTCCCGGGCTT
 50 CAGGAATTTGCACATAGACGACCAAAATCACGCTCATCCAATATTCTGGATGAG
 TCTCATGGTCTTTGGTCTCGGTTGGCGCAGCTATAAGCACGTCTCTGGCCAGAT
 GTTGATTTTCGCACCAGACCTGATCCTGAACGAACAGAGGATGAAGGAATCAA
 GCTTTTACTCTCTGCTGACTATGTGGCAAAATCCCCAAGAATTCGTGAAAC
 TTCAAGTTTCCCAAGAAGAATTCCTCTGCATGAAAGTCCTTCTTTTGCTCAACA
 55 CGATTCCCCTGGAAGGCTTGAGGTCTCAAACGCAATTCGAGGAGATGCGGAGT
 AGCTATATACGCGAACTCATCAAGGCCATCGGTTTGCAGCAAAAGGGAGTGGT
 CTCTAGTAGCGCAACTTATACAGCTGACTAAGCTCCTTGACAACCTTCACGA
 TCTCGTCAAACAACCTGCACCTGTACTGTCTTAACACATTTATACAATCACGGGC
 ACTTTTCTGTAGAGTTCCAGAGATGATGTCTGAGGTCATCGCAGCCCAACTTC
 60 CGAAAATTCCTGAGGAATGGTGAAGCCACTTCTGTTCCATAAGAAAaGATCCg
 gatctggaagtggctccCTGAGAGTGAAGTTAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTAT
 CAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGCGGGAA
 GAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGCGGGGCAGGGACCCTGAAATGGGCGGCA
 AACCCAGACGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAAG
 65 ACAAGATGGCCGAGCCTACAGCGAGATCGGAATGAAGGCGAGCGCGCGGA
 GAGGCAAGGGACATGATGGCCTGTACCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGA

CACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGAggaagtggatctgggagcgg
ctctatggtgtctaagggggaagaggacaacatggccatcatcaaagaattcatgcggttcaaggtgcacatggaaggctccgt
gaatggccacgaattcgagatcgagggggagggcgagggcgagaccttatgaggaaccagaccgccaagctgaaagtga
ccaagggcgagaccctgcttctcgctgggatatcctgtctcccagtttatgtacggcagcaaggcctacgtgaagcaccg
5 cgcacatccccgactacctaagctgagcttccctgagggctcaagtgggagagagtgatgaattcgaggacggcggagtc
gtgacagtgaaccagatagctctctgcaggacggcgagttcatctacaaagtgaagctgcggggcaccaacttcccagcga
cggaccctgtgatgcagaaaaagaccatgggctgggagggccagctccgagagaatgtaccagaggacggggccctgaagg
gggagatcaagcagcggctgaaactgaaggtggcgccactacgacgcagaagtgaaccacctaagccaagaaa
cctgtgcagctgcctggcgctacaatgtgaacatcaagctggacattaccagccacaacgaggactacaccatcgtggaaca
10 gtacgagcggggcggaggcgagcattctacaggcggaatggtgaactgtataagtgcgtgaccgac

SEQ ID NO: 52

MIHLGHILFLLLLPVAAADYKDDDDKQTPGERSSLPAYFPGTSGSCSGCSLSLP
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
15 PEEEEGGCELGSGSGSGSQDIQLIPPLINLLMSIEPDVIYAGHDNTKPDTSLLTS
LNQLGERQLLSVVKWSKSLPGFRNLHIDDQITLIQYSWMSLMVFLGWRSYKHV
SGQMLYFAPDLILNEQRMKESSFYSLCLTMWQIPQEFVKLQVSQEEFLCMKVLL
LNTIPLEGLRSQTQFEEMRSSYIRELIKAIGLRQKGVVSSSRFYQLTKLLDNLHDL
VKQLHLYCLNTFIQSRALSVEFPEMMSEVIAAQLPKILAGMVKPLL FHKRSGSGSG
20 SGLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPRGSGSGSMVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEG
EGEGRPYEGTQAKLKVTKGGLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLS
FPEGFKWERVMNFEDGGVVTVDSSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKK
25 TMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVLPG
AYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKCVTD

El polipéptido de SEQ ID NO: 52 incluye los siguientes dominios: péptido señal Dap10 (MIHLGHILFLLLLPVAAA, SEQ ID NO: 53), etiqueta FLAG (DYKDDDDK, SEQ ID NO: 54), dominio extracelular Dap10 (QTPGERSSLPAYFPGTSGSCSGCSLSLP, SEQ ID NO: 55), dominio transmembrana CD5 (IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC, SEQ ID NO: 56), dominio coestimulador 4-1BB (KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL, SEQ ID NO: 57), primer enlazador (GSGSGSGS, SEQ ID NO: 58), LBD del receptor de progesterona (GQDIQLIPPLINLLMSIEPDVIYAGHDNTKPDTSLLTSLNQLGERQLLSVVKWSKSLPGFRNLHIDDQITLIQYSWMSLM VFLGWRSYKHVSGQMLYFAPDLILNEQRMKESSFYSLCLTMWQIPQEFVKLQVSQEEFLCMKVLLLNNTIPLEGLRSQT QFEEMRSSYIRELIKAIGLRQKGVVSSSRFYQLTKLLDNLHDLVKQLHLYCLNTFIQSRALSVEFPEMMSEVIAAQLPKILG MVKPLL FHKK, SEQ ID NO: 59), segundo enlazador (RSGSGSGS, SEQ ID NO: 60), dominio de señalización CD3zeta (LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR, SEQ ID NO: 61), tercer enlazador (GSGSGSGS, SEQ ID NO: 62) y mCherry (MVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGRPYEGTQAKLKVTKGGLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVDSSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK CVTD, SEQ ID NO: 63)

La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 51 incluye las siguientes secuencias que codifican los dominios indicados: péptido señal Dap10 (ATGATCCACCTGGGACACAT CCTGTTTTGCTGCTGCTGCCAGTGGCTGCCGCC, SEQ ID NO: 63), etiqueta FLAG (gattacaagagcagcatgataaa, SEQ ID NO: 64), dominio extracelular Dap10 (CAGACAAC ACCAGGCGAGAGATCTAGCCTGCCCGCCTTCTACCCTGGCACCAGCGGCTCTTGTTCTGGCTGTGGCAGCCTGTCT CTGCCC, SEQ ID NO: 65), dominio transmembrana CD5 (atctatatattgggacccctggctggaacctgcggagtgctgctgtctctctgattacactgtattgc, SEQ ID NO: 66), dominio coestimulador 4-1BB (AAAAGGGGGCCGAAAAAGCTGCTGTATATTTTCAAACAGCCTTTTATGAGGCCTGTGCAGACAACACAGGAAGAGG ACGGCTGTAGCTGTCTGGTTCCCCGAAGAGGAAGAGGGGGGCTGCGAACTQ SEQ ID NO: 67), primer enlazador (ggatcaggcagtgctctggcagc, SEQ ID NO: 68), receptor de progesterona LBD (GGGCAAGACATTACGCTCATACCTCCTTTGATAAATTTGCTGTCTATAGAACCAGATGTCATATACGCTGGTCA CACAATACGAAACCGACACATCTTCATCTTTGCTTACCTCTCTGAATCAACTGGGTGAACGACAGCTCCTGAGTGT TGTAAAGTGGTCTAAAAGCCTCCCGGGCTTCAGGAATTTGCACATAGACGACCAATACGCTCATCCAATATTCCT GGATGAGTCTCATGGTCTTTGGTCTCGGTTGGCGCAGCTATAAGCACGTCTCTGGCCAGATGTTGATTTTCGCACCA GACCTGATCCTGAACGAACAGAGGATGAAGGAATCAAGCTTTTACTCTCTCTGCTTGACTATGTGGCAAATCCCCCA AGAATTCGTGAACTTCAAGTTTCCCAAGAAGAAATTCCTCTGCATGAAAGTCCTTCTTTTGCTCAACACGATTCCCCCT GGAAGGCTTGAGGTCTCAAACGCAATTCGAGGAGATGCGGAGTAGCTATATACGCGAACTCATCAAGGCCATCGGT TTGCGGCAAAAGGGAGTGGTCTCTAGTAGCCAAACGATTTTACCAGCTGACTAAGCTCCTTGACAACCTTCACGATCT CGTCAAACACTGACCTGTACTGTCTTAACACATTTATACAATCACGGGCACTTTCTGTAGAGTTCCAGAGATGAT GTCTGAGGTCATCGCAGCCCAACTTCCGAAATTTCTGCAGGAATGGTGAAGCCACTTCTGTTCCATAAGAAA, SEQ ID NO: 69), segundo enlazador (ggatctggaagtggctcc, SEQ ID NO: 70), dominio de señalización CD3zeta

(CTGAGAGTGAAGTTTAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTG AACCTGGGCAGGCGGGAAGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGCGGGGACCCCTGAAATGGGCGGCAAACC CAGACGGAAGAACCCCAAGGAAAGGCCTGTACAACGAAGTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGA TCGGAATGAAGGGCGAGCGGCGGAGAGGCAAGGGACATGATGGCCTGTACCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAG GACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGA, SEQ ID NO: 71), tercer enlazador (ggaagtggatctgggagcggtct, SEQ ID NO: 72) y mCherry (atggtgtctaaggggaagaggacaacatggccatcatcaaagaattcatgcggtcaaggtgcacatggaaggctccgtgaatggccacgaattcgagatcgagg ggagggcgagggcagacctatgaggggaacccagaccgccaagctgaaagtgaaccaaggcgaccctgccttcgctgggatctgtctccccagtttatgtac ggcagcaaggcctacgtgaagcaccgccgacatcccgactacctaagctgagcttccctgagggctcaagtgggagagatgataatttcgaggacggcg agtcgtgacagtgaccaggatagctctctgcaggacggcgagttcatctacaaagtgaagctgcggggcaccaactccccagcgacggaccctgatgcagaaaa agaccatgggctgggagggcagctccgagagaatgtaccagaggacggggccctgaagggggagatcaagcagcggtgaaactgaaggatggcgccactac gacgcagaagtgaaccacctaaggccaagaacctgtgcagctgcctggcgctacaatgtgaacatcaagctggacattaccagccacaacgaggactaca ccatcgtggaacagtacgagcgggcgaggcgaggcattctacaggcggaatggatgaactgtataagtgcgtgaccgac, SEQ ID NO: 73)

15 Ejemplo 7: La activación de células CAR-T NHR-LBD inducida por ligando depende del antígeno y del fármaco

Las células T humanas primarias se transdujeron con vectores lentivirales que codifican el constructo CAR J6M0-ERa-LBD. La activación de las células T se evaluó mediante tinción de superficie para el marcador canónico de activación de células T, CD69, después del cocultivo durante la noche con objetivos negativos al antígeno (línea celular K562) y positivos al antígeno (línea celular MM1S) en presencia de concentraciones crecientes de 4-OHT (Figura 7A). Se observó una respuesta de células T única y dependiente de la dosis para cada construcción, y la proximidad del LBD a la membrana celular se correlacionó con la activación de fondo (activación en ausencia de ligando) y la sensibilidad al ligando. Todas las construcciones mostraron niveles de activación comparables al control positivo (CAR canónico) a concentraciones crecientes del fármaco.

La capacidad de las células CAR J6M0-ERa-LBD para producir citocinas inflamatorias se evaluó mediante ELISA de IFN- γ en sobrenadantes de cocultivo aislados de cocultivos nocturnos de células T con objetivos negativos al antígeno (línea celular K562) y positivos al antígeno (línea celular MM1S) en presencia de concentraciones crecientes de 4-OHT. Se demostró que la producción de IFN- γ depende de la dosis, y todas las construcciones NHR-LBD producen citocinas a concentraciones crecientes de ligando (Figura 7B).

30 Ejemplo 8: La proliferación y la muerte de células CAR T NHR-LBD inducidas por ligando dependen del antígeno y del ligando

Las células T CD4 humanas primarias se transdujeron con vectores lentivirales que codifican V4 FMC63-ERa-LBD CAR o controles CAR canónicos. Las células se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína ("CFSE") antes del cocultivo con objetivos negativos al antígeno (línea celular K562) o positivos al antígeno (línea celular Raji). Las células también se cocultivaron con concentraciones crecientes de ligando (4-OHT). Tres días después del cocultivo, las células se analizaron mediante citometría de flujo y se evaluó la proliferación mediante dilución del colorante CFSE en células T CD4⁺. Las células CAR-T FMC63-ERa-LBD proliferaron solo en presencia de antígeno y ligando (Figura 8A).

Las células T humanas primarias se transdujeron con vectores lentivirales que codifican el constructo CAR J6M0-ERa-LBD descrito en el Ejemplo 7. Se evaluó la capacidad de las células T que llevan el constructo CAR J6M0-ERa-LBD para matar objetivos positivos para el antígeno (línea celular MM1S) de manera dependiente del fármaco mediante un ensayo de muerte basado en citometría de flujo. Las células objetivo se marcaron con CFSE antes del cocultivo y la cantidad de células restantes en cada pocillo después del cocultivo se determinó mediante la cuantificación de un volumen fijo utilizando el citómetro de flujo Intellicyt. La lisis específica se determinó comparando la cantidad de objetivos restantes por pocillo experimental con la cantidad de objetivos restantes en los pocillos de control que contenían tanto objetivos como células T CAR convencionales no específicas de antígeno (CTRL). La lisis específica se informó como un porcentaje derivado de la siguiente ecuación: $1 - (\# \text{ de eventos por pocillo de experimento} / \# \text{ de eventos promedio} - \text{ pocillos CTRL})$. La eliminación de células diana dependió de la dosis del ligando, y todas las construcciones eliminaron dianas positivas para antígenos en niveles comparables al CAR convencional (+ CTRL) en dosis más altas del fármaco (Figura 8B).

55 Ejemplo 9 - La ubicación del LBD dentro del polipéptido CAR determina la sensibilidad a la expresión de superficie inducida por ligando del CAR NHR-LBD

La respuesta a la dosis de las construcciones V2, V3 y V4 que se muestran en la Figura 1 se comparó en células T Jurkat. La detección de la expresión superficial de la proteína CAR NHR-LBD en células T Jurkat se realizó después de la incubación durante una hora con el ligando 4-OHT a las concentraciones indicadas en el eje x de la Figura 9. La expresión del receptor de superficie se detectó utilizando un anticuerpo anti-cMyc y se informó como un porcentaje de células reporteras positivas (según lo determinado por la expresión de mCherry). La dosis de ligando en la que se detectó la expresión de superficie para cada construcción correspondió a la ubicación del LBD, en relación con la membrana de superficie, para cada construcción. El constructo V4, que alberga el LBD inmediatamente adyacente a la membrana superficial, no mostró una expresión superficial detectable en ausencia de ligando, y la expresión superficial se detectó solo en concentraciones más altas de 4-OHT. Por el contrario, cuando el LBD se encontraba más alejado de la membrana (véase, por ejemplo, V2), se detectó un nivel basal más alto de expresión superficial (~20 %) y se observó una mayor

sensibilidad al 4-OHT. La activación de las células T Jurkat con PMA/ionomicina no condujo a la expresión de la superficie del CAR NHR-LBD independiente del ligando, lo que demuestra que la activación de la célula T sola (a través del TCR endógeno, por ejemplo) no da como resultado el tráfico del receptor a la superficie celular.

5 Ejemplo 10: La duración de la expresión de la superficie del CAR NHR-LBD depende de la ubicación del LBD en el polipéptido

10 Las células T se transdujeron con CAR FMC63-ERa-LBD y se expusieron a 4-OHT a 35 ng/mL durante una hora antes de tñirlas para expresión superficial usando un anticuerpo anti-cMyc o lavarlas y cultivarlas durante la noche en ausencia de fármaco (la línea de tiempo se muestra en la Figura 10A).

15 El número de células que expresan proteína de superficie se informó como un porcentaje de células reporteras positivas (según lo determinado por la expresión de mCherry). Se determinó la duración de la expresión de NHR LBD CAR en la superficie celular para los constructos V2, V3 y V4. El constructo que albergaba el LBD más proximal a la membrana (V4) mostró el retorno más rápido y completo a la línea base 24 horas después de la eliminación del ligando (Figura 10B, barras etiquetadas como "V4").

Ejemplo 11 – Cinética de la expresión superficial en construcciones NHR-LBD-CAR después de la adición del ligando

20 Las células T Jurkat se transdujeron con el constructo FLAG-ERa-LBD utilizado en el Ejemplo 5, se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de 4-OHT durante 15 minutos o 120 minutos, y se detectó la expresión de la superficie después del tratamiento con ligando. El tratamiento con ligando indujo la expresión superficial en 15 minutos y se observó una mayor regulación positiva con el tiempo (Figura 11A).

25 Las células T humanas se transdujeron con un vector lentiviral que codifica el CAR LBD FMC63-ERa (v2 como se muestra en la Figura 1) Las células se trataron con el ligando ERa 4-OHT durante la duración indicada y luego se tñieron para la expresión superficial del CAR (Figura 11B). Los datos de la Figura 11B muestran una cinética similar para la expresión de superficie inducida por el tratamiento con ligando a la observada para las células T Jurkat.

30 Ejemplo 12: El tratamiento con brefeldina A bloquea el tráfico de superficie inducido por ligando de fusiones de NHR LBD

35 Las células T humanas primarias que expresan FMC63-CAR con fusión ERa LBD se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de ligando 4-OHT durante dos horas para inducir la expresión superficial del CAR. Antes del tratamiento con 4-OHT, la mitad de las células fueron tratadas previamente con 1 uM de Brefeldina A (Figura 12, dos paneles inferiores) para inhibir la exportación de proteínas desde el Golgi. El tratamiento previo con Brefeldina A impidió el aumento inducido por 4-OHT en la expresión de proteínas de superficie Sin querer limitarnos a la teoría, estos datos sugieren que el aumento de la expresión superficial surge de la relocalización de un grupo de polipéptidos que está secuestrado intracelularmente en ausencia de ligando.

40 Ejemplo 13 - Generación de constructos

45 Se modificó un receptor de antígeno quimérico convencional ("CAR convencional", Figura 13, izquierda) para incluir el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno alfa ("ERa") ("ERa LBD", Figura 1, en verde) ya sea en la porción intracelular de la proteína (v2 CAR como se describe en el Ejemplo 1) o en la porción extracelular de la proteína ("Concealed Carry' CAR ECD.v1" o "LBD-ECD CAR"). Se introdujeron mutaciones puntuales en el dominio LBD de ERa tanto del CAR v2 como del CAR ECD.v1. Las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos de v2 CAR (se muestran arriba como SEQ ID NOs: 30 y 31) y ECD.v1 (SEQ ID NOs: 97 y 98) se revelan a continuación.

SEQ ID NO: 97 (ECD v.1 CAR)

50 atgcttctcctggtgacaagccttctgtctgtgagttaccacaccagcattcctcctgattcctgaacagaagctgataagtgaggaggacttgacatccagatgaccca
gaccagcagcctgagcgccagcctggcgatagagtgaccatcagctgcagagccagcaggacatcagcaagtagctgaactggtatcagcagaaacccgacgg
caccgtgaagctgctgatctaccacaccagcagactgcacagcggcgtgccagcagattttctggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccttccaacctg
gaacaggaagatatcgctacctacttctgtcagcaaggcaaacacctgcccacacctcggcgaggcaccacagctggaaatcacaggcggcgaggatctggcgg
55 aggcggaagtggcgagggggatctgaagtgaactgcaggaaagcgccctggcctggctggcccatctcagctctgagcgtgacctgtacctgtccggcgtgtcc
ctgcctgactatggcgtgtcctggatcagacagccccagaaaggcctggaatggctggagtgatctgggcagcgagacaacctactacaagcgccttgaa
gtcccggtgacctcatcaaggacaactccaagagccaggtgttctgaagtgaacagcctgcagaccgacgacacccgcatctactactgcgccaagcactacta
ctacggcgccagctacgcatgactactggggcagggcacaagcgtgacctgtctagcggatccgatagaagaggcggcagaatgctgaacacaagcggca
60 gaggcagcaggggaagcagagcgagggcgagtgatctgcggcgatagagccgccaacctgtggcctagccccctgatgatcaagcggagcaagaagaact
ccctggccctgagcctgacgcggcagcagatggtgtcctgtcgtgatccgagcccccatcctgttacagcgagtagcaccaccagacccctcagcgaggcca
gcatgatgggctgctgaccaacctggcgaccgggaactggtgcacatgatcaactgggccaagcgggtgcccggcttcgtggtatgacactgcacgaccaggtg
cacctgtggaatgcgttggtgctgaaatcctgatgatcgctcgtgtggcgagcatggaacacctggcaagctgctgttcgccccaaactgctgtgacgggaa
ccagggcaaatgcgtggaaggcatggtgaaatctcgacatgctgtgcccacctcagccggtccggatgatgaacctgcaggcggaagagtctgtgtctgaagt
ccatcatcctgctgaatagcggcgtgtacaccttctgagcagcacctgaaaagcctggaagaaaaggaccacatccaccgggtgtggaagatcccgacacc
65 ctgattcacctgatggcaaggcggactgacctgcagcagcagcatcagagactggctcagctgctgacatcctgtccacatccggcacatgatgacaagaaggc
atggaacatctgtacagcatgaagtcaagaacgtggtcctctgttcgatctgctgctggaatgctggaaatgctggacgccaacaggtgcacgccccaacatccggtatccaccac
gacgccagcgcggcagaccaccaaacccggcgccccaccatcgctgcagccccgttcctgctgcccagaggcgtgcccggcagcggcgggggcgagtgacaca

cgagggggctggactcgcctgtgatattacatctggcgccctggcgccggactgtggggctctctcctgtcactggttatcaccctttactgcaaacggggcagaaag
 aaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttcagaagaagaaggaggatgtgaactgag
 agtgaggtcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggaca
 agagacgtggcgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctac
 5 agtgagattgggatgaaaggcgagcgcggagggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccctcacatgc
 aggcctgccccctcgtag

SEQ ID NO: 98 (ECD v.1 CAR)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEQKLISEEDLDIQTMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHT
 10 SRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESG
 PGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKVFLKMNLSLQTD
 DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGSDRRGGRMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMRAANLWPSPLMIK
 RSKKNSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDTPRPFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLL
 ECAWLEILMIGLVWRSMHPGKLLFAPNLLLDNRNQGKCEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYT
 15 FLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTQQQHQLAQLLILSHIRHMSNKRMEHLYSMKCKNVVPLFDLLE
 MLDARHLHAPTSGSTTTPAPRPPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
 CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
 DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20 La secuencia de proteína y ácido nucleico de cada dominio en ECD.v1, que va desde el extremo N al extremo C, en ECD.v1 se muestra a continuación.

SEQ ID NO: 99 (péptido señal de CSF2RA)

atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattctcctgattcct

25

SEQ ID NO: 100 (péptido señal de CSF2RA)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

SEQ ID NO: 101 (etiqueta cMyc)

30 gaacagaagctgataagtgaggaggacttg

SEQ ID NO: 102 (etiqueta cMyc)

EQKLISEEDL

SEQ ID NO: 103 (FMC63 V_L)

gacatccagatgaccagaccaccagcagcctgagcgcagcctggcgatagagtgaccatcagctgcagagccagccag
 gacatcagcaagtagcctgaactggtatcagcagaaaaccgacggcaccgtgaagctgctgatctaccacaccagcagactgca
 cagcggcgtgccagcagatcttctggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctcaacctggaacaggaagata
 40 tcgtactactctgtcagcaaggcaacaccctgccctacaccttcggcgaggacccaagctggaatcaca

40

SEQ ID NO: 104 (FMC63 V_H)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLH
 SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT

SEQ ID NO: 105 (enlazador (G4S)₃ entre V_L y V_H)

ggcgcgaggagatcggcgaggcggaagtggcgagggggatct

SEQ ID NO: 106 (enlazador (G4S)₃ entre V_L y V_H)

GGGGSGGGSGGGGS

50

SEQ ID NO: 107 (FMC63 V_H)

gaagtgaactgcaggaaagcgccctggcctggtggcccatctcagctctgagcgtgacctgtaccgtgtccggcgtgtcc
 ctgctgactatggcgtgtcctggtatcagacagccccagaaaggcctggaatggctgggagtgatctgggagcagcaga
 caacctactacaacagcgcctgaagtcccgctgacctatcataggacaactccaagagccaggtgttctgaagatgaac
 55 agcctgcagaccgacgacaccgcatctactgcgcaagcactactactacggcgagctacgccatggactactggg
 gccagggcacaagcgtgacctgtctagc

SEQ ID NO: 108 (FMC63 V_H)

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKVFL
 60 KMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS

Enlazador GS entre el dominio V_H y el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno alfa
 ggtacc

Enlazador GS entre el dominio V_H y el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno alfa
 GS

SEQ ID NO: 109 (Dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno alfa) (secuencia que codifica la bisagra subrayada, secuencia que codifica la hélice 12 en negrita)

gatagaagagggcgccagaatgctgaaacacaagcgccagagggacgacggggaaggcagagggcgaagtgggatctgccg
 5 gcgatatgagagccgccaacctgtgacctagccccctgatgatcaagcgagcaagaagaactccctggccctgagcctgac
 cgccgaccagatggtgtctgacctgtggtgacgagcccccatcctgttacagcgagtagcagccccaccagacccttcagcg
 aggccagcatgatggggcctgctgaccaacctggccgacccgggaactggtgcacatgatcaactgggccaagcgggcgccg
 gcttcgtggatctgacactgcacgaccaggtgcacctgctggaatgcctggctggaaatcctgatgatcgccctcgtgtggcg
 gagcatggaacacctggcaagctgctgtccgcccccaacctgctgctggaccggaaccagggcaaatgctggaaggcatg
 10 gtggaaatcttcgacatgctgctggccacctccagccggttcggatgatgaacctgcagggcgaagagttcgtgtctgaagt
 ccatcatcctgctgaatagcggcgtgtacacctcctgagcagcaccctgaaaagcctggaagaaaaggaccacatccaccgg
 gtgctggacaagatcacgacacctgattcacctgatggccaagccggactgaccctgcagcagcagcatcagagactgg
 ctgactgctgctgatcctgtcccacatccggcacatgagcaacaagcggatggaacatctgtacagcatgaagtgaagaacg
 15 **tggtgcctcgttgcgatctgctgctggaatgctggacgcccacaggctgcacgccccaacatcc**

SEQ ID NO: 110 (Dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno alfa) (bisagra subrayada, hélice 12 en negrita)

DRRGGRMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLSLALS
 20 LTADQMVSALLDAEPPILYSEYDTPRPFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKR
 VPGFVDLTLHDQVHLLCAWLEILMIGLVWRSMHPGKLLFAPNLLDRNQKGC
 VEGMVEIFDMLLATSSRFMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKD
 HIHRVLDKITDTLIHLMKAGLTQQQHQLAQLLLILSHIRHMSNKRMEHLYS
 25 MKCKNVVPLFDLLEMLDAHRLHAPTS

Enlazador GS entre el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno alfa y la región bisagra alfa del CD8
 ggatcc

Enlazador GS entre el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno alfa y la región bisagra alfa del CD8
 30 GS

SEQ ID NO: 111 (bisagra alfa de CD8)

accacgacgccagcgccgaccaccaacaccggcgcccaccatcgctgcagcccctgtccctgcgcccagaggcggtg
 35 ccggccagcgccggggggcgagtgacacagagggggctggacttcgctgtgatctacatctggcgcccttgggccgg
 gacttggtgggtcctctcctgtcactggttatcaccctttactgc

SEQ ID NO: 112 (bisagra alfa de CD8)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC

SEQ ID NO: 113 (dominio transmembrana alfa de CD8)

gatatacatatctggcgcccttgccgggacttggtgctctcctgtcactggtatcaccctttactgc

SEQ ID NO: 114 (dominio transmembrana alfa de CD8)

DIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC

SEQ ID NO: 115 (dominio coestimulador 4-1BB)

aaacggggcagaaagaaactcgttatattcaacaaccattatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgta
 gctgccgatttcagaagaagaaggaggatgtgaa

SEQ ID NO: 116 (dominio coestimulador 4-1BB)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCE

SEQ ID NO: 117 (dominio de señalización CD3 zeta)

ctgagagtgaagttcagcaggagcgagacgcccccgctaccagcaggggccagaaccagctctataacgagctcaatctag
 55 gacgaagagaggagtagatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggagaac
 cctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggcctacagttagattgggatgaaaggcgagcgcc
 ggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagcccaaggacacctacgacgccccttcacatgcaggc
 cctgccccctgcg

SEQ ID NO: 118 (dominio de señalización CD3 zeta)

LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
 KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Ejemplo 14: LBD-ECD reduce la localización de fondo del CAR a la superficie celular en ausencia de ligando

Las células T humanas primarias se transdujeron con vectores lentivirales que codificaban el constructo CC.v2 o LBD
 65 ECD.v1 como se indica. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con 500 ng/mL de 4-OHT. La duración del

tratamiento fue la que se muestra en la Figura 14. Posteriormente, las células se tiñeron para la expresión superficial del receptor quimérico utilizando el anticuerpo anti-Myc AlexaFluor 647.

La colocación del LBD en la porción extracelular del CAR reduce los niveles de fondo de la expresión de la superficie del CAR cuando no se ha añadido el ligando, en relación con cuando el LBD se coloca en la porción intracelular del CAR (Figura 14). Tanto v2 CAR como ECD.v1 se expresaron en la superficie de las células cuando se añadieron 500 ng/ml de 4-OHT.

Ejemplo 15 - El LBD-ECD CAR mata células de una manera dependiente del fármaco

Las células T humanas primarias se transdujeron con vectores lentivirales que codificaban el constructo LBD ECD.v1 o CAR de control como se indica. Las células T se dejaron reposar después de la expansión y posteriormente se cocultivaron con células tumorales Nalm6 que expresaban luciferasa en una relación efector:objetivo que se muestra en la Figura 15. Después de 24 horas de cocultivo, las células se lisaron y se añadió sustrato de luciferasa para cuantificar el número de células tumorales supervivientes.

LBD ECD.v1 CAR mata células de manera dependiente del fármaco. La adición de cantidades crecientes de 4-OHT conduce a mayores niveles de lisis celular (aproximadamente 50 % de lisis a 500 ng/mL de 4-OHT) (Figura 15).

Ejemplo 16 - El LBD-ECD CAR se localiza intracelularmente en células T activadas

Las células T humanas primarias se transdujeron con vectores lentivirales que codifican el constructo CAR de control constitutivo, LBD_ECD, CC.v2 o como se indica. Después de que las células descansaron, se volvieron a estimular con dynabeads aCD3/aCD28 durante 48 horas. Posteriormente, las células se tiñeron con anticuerpo anti-Myc para detectar la expresión superficial del CAR y se analizaron mediante citometría de flujo.

Los CAR con un LBD extracelular (LBD ECD v1) se localizan intracelularmente en las células T que se activan cuando se exponen a perlas CD3/CD28. Los CAR con un LBD intracelular (CAR v2) muestran cierta localización en la superficie celular en las células T activadas (Figura 16)

Ejemplo 17 - ECD.v1 CAR (LBD ECD) produce citocina IL-2

La producción de IL-2 de las células CAR-T ECD.v1 se comparó con el control CAR+ convencional después del cocultivo durante la noche de células T portadoras de CAR con objetivos NALM-6 en presencia (500 ng/mL) o ausencia de 4-hidroxitamoxifeno (Figura 16). La producción de IL-2 a partir del receptor CAR ECD.v1 (Figura 13) fue comparable al control CAR convencional, dependiente de 4-hidroxitamoxifeno e indetectable en ausencia de fármaco.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido quimérico de cadena única, en donde el polipéptido quimérico de cadena única comprende:

- 5 un dominio de unión a antígeno extracelular;
un dominio transmembrana;
un dominio de señalización intracelular; y
un dominio de unión al ligando del receptor de hormonas,
en donde:
- 10 el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas se encuentran directamente adyacentes entre sí o están separados por 1 a 700 aminoácidos; y
el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando del receptor de hormonas no están ambos presentes en el mismo polipéptido de cadena única endógeno en un mamífero; en donde el dominio transmembrana comprende al menos una secuencia de aminoácidos contigua que atraviesa una bicapa lipídica y tiene una estructura secundaria α -helicoidal en la bicapa lipídica cuando está presente en un polipéptido endógeno correspondiente cuando se expresa en una célula de mamífero; y
en donde el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno, un receptor de progesterona o un receptor de andrógenos,
en donde cuando el polipéptido quimérico de cadena única se expresa en una célula, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas es extracelular y en donde:
- 25 (i) cuando va en la dirección N-terminal a C-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única comprende el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelular, el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular; o
(ii) cuando va en la dirección C-terminal a N-terminal, el polipéptido quimérico de cadena única comprende el dominio de unión al antígeno extracelular, el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas extracelular, el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular.
- 30 2. Polipéptido quimérico de cadena única según la reivindicación 1, en el que el dominio de señalización intracelular comprende un dominio coestimulador y un motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (ITAM), en el que el ITAM del receptor de antígeno quimérico de cadena única comprende preferiblemente una secuencia de señalización citoplasmática de CD3 ζ .
- 35 3. Polipéptido quimérico de cadena única de la reivindicación 2, en el que el dominio de unión al antígeno extracelular se selecciona del grupo que consiste en: un scFv, un (scFv)₂, un dominio V_HH y un dominio V_{NAR}, en el que el dominio de unión al antígeno extracelular es preferiblemente un scFv.
- 40 4. Polipéptido quimérico de cadena única según la reivindicación 2 o 3, en el que el dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a un único antígeno o se une específicamente a dos antígenos diferentes, en el que preferiblemente el único antígeno o al menos uno de los dos antígenos diferentes es un antígeno tumoral, tal como un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en: CD19, WT-1, CD22, L1-CAM, ROR-1, CD30, CD125, AFP, CEA, ETA, MAGE y MUC16, en particular en el que el antígeno tumoral es CD19.
- 45 5. Polipéptido quimérico de cadena única según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de: una cadena α de un receptor de células T, una cadena β de un receptor de células T, una cadena ζ de un receptor de células T, CD28, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137 o CD154.
- 50 6. Polipéptido quimérico de cadena única de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el dominio de unión del ligando del receptor de hormona es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno.
- 55 7. Polipéptido quimérico de cadena única según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el dominio de unión del ligando del receptor de hormona extracelular es un dominio de unión del ligando de un receptor de estrógeno humano, en el que el dominio de unión del ligando del receptor de estrógeno humano tiene preferiblemente una secuencia de tipo salvaje, excepto que comprende una o ambas de una sustitución en la posición de aminoácido 521 y una sustitución en la posición de aminoácido 537, cada una numerada en relación con la secuencia de tipo salvaje de longitud completa del receptor de hormona humana.
- 60 8. Polipéptido quimérico de cadena única según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el dominio de unión del ligando del receptor de hormonas y el dominio transmembrana están separados por 1 a 500 aminoácidos, como por ejemplo por 1 a 250 aminoácidos, por 1 a 100 aminoácidos, por 1 a 50 aminoácidos o por 1 a 25 aminoácidos.
- 65 9. Polipéptido quimérico de cadena única según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el dominio coestimulador es un dominio coestimulador citoplasmático de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1,

PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C y B7-H3, en particular de 4-1BB o CD28.

10. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico de cadena única de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.

12. Una célula de mamífero que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10 o el vector de la reivindicación 11.

13. Célula de mamífero según la reivindicación 12, en la que la célula de mamífero es una célula T, tal como una célula T seleccionada del grupo que consiste en: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula T_{reg} y una célula T asesina natural.

14. Un método *in vitro* para inducir la localización en la membrana plasmática de un polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero, comprendiendo el método:
poner en contacto una célula de mamífero que expresa el polipéptido quimérico de cadena única de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula.

15. Polipéptido quimérico de cadena única según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método de terapia, preferiblemente para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un mamífero que tiene cáncer, en el que el polipéptido quimérico de cadena única se va a expresar en una célula de mamífero y el método comprende inducir la localización en la membrana plasmática del polipéptido quimérico de cadena única en una célula de mamífero que expresa el polipéptido quimérico de cadena única poniendo en contacto la célula de mamífero con una cantidad de una hormona o un análogo de hormona suficiente para inducir la localización del polipéptido quimérico de cadena única en el lado extracelular de la membrana plasmática de la célula.

16. El método de la reivindicación 14, o el polipéptido quimérico de cadena única para uso de la reivindicación 15, en el que la célula de mamífero es una célula T, tal como una célula T seleccionada del grupo que consiste en: una célula T CD8⁺, una célula T CD4⁺, una célula T de memoria, una célula T_{reg} y una célula T asesina natural.

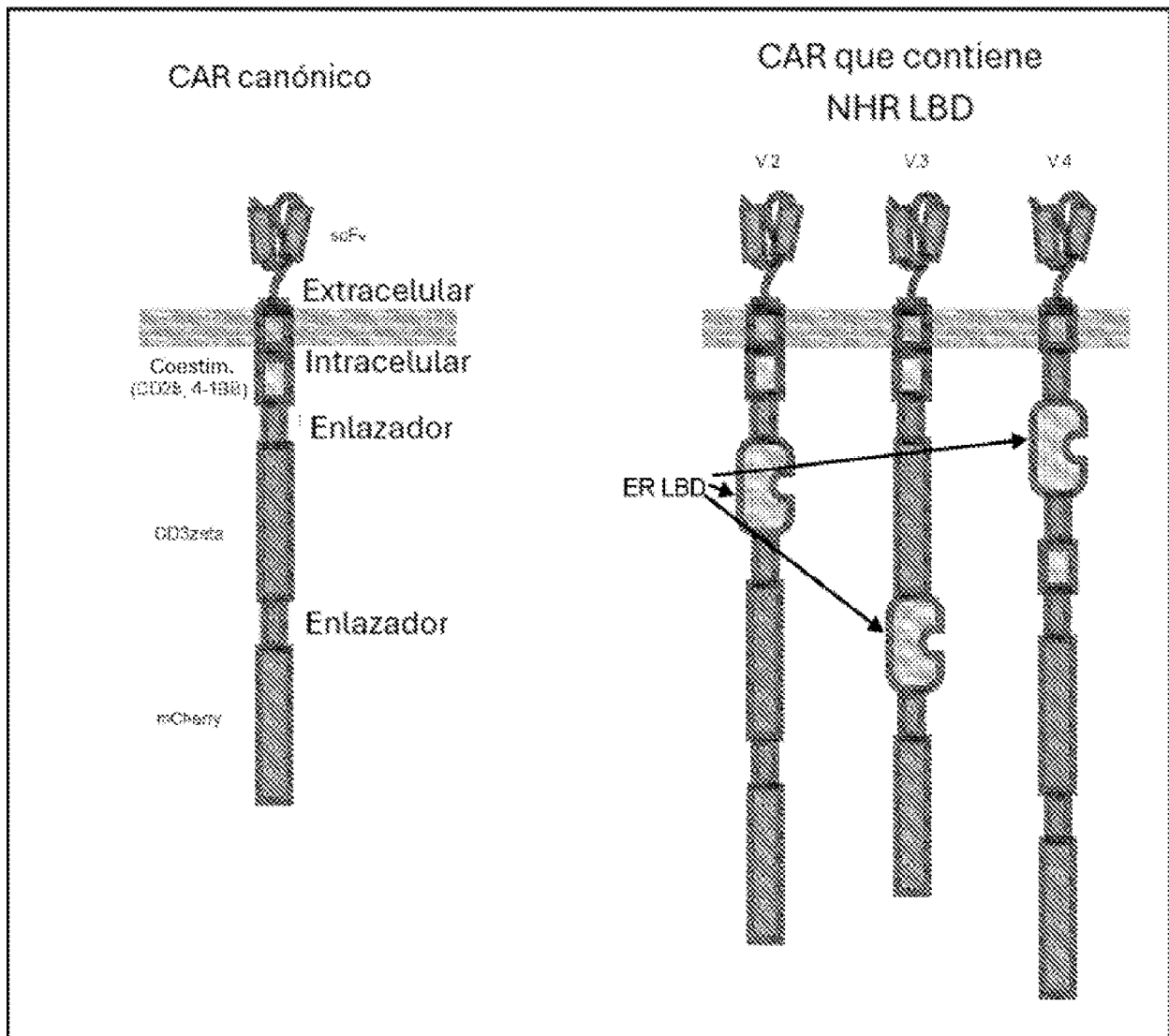


FIG. 1

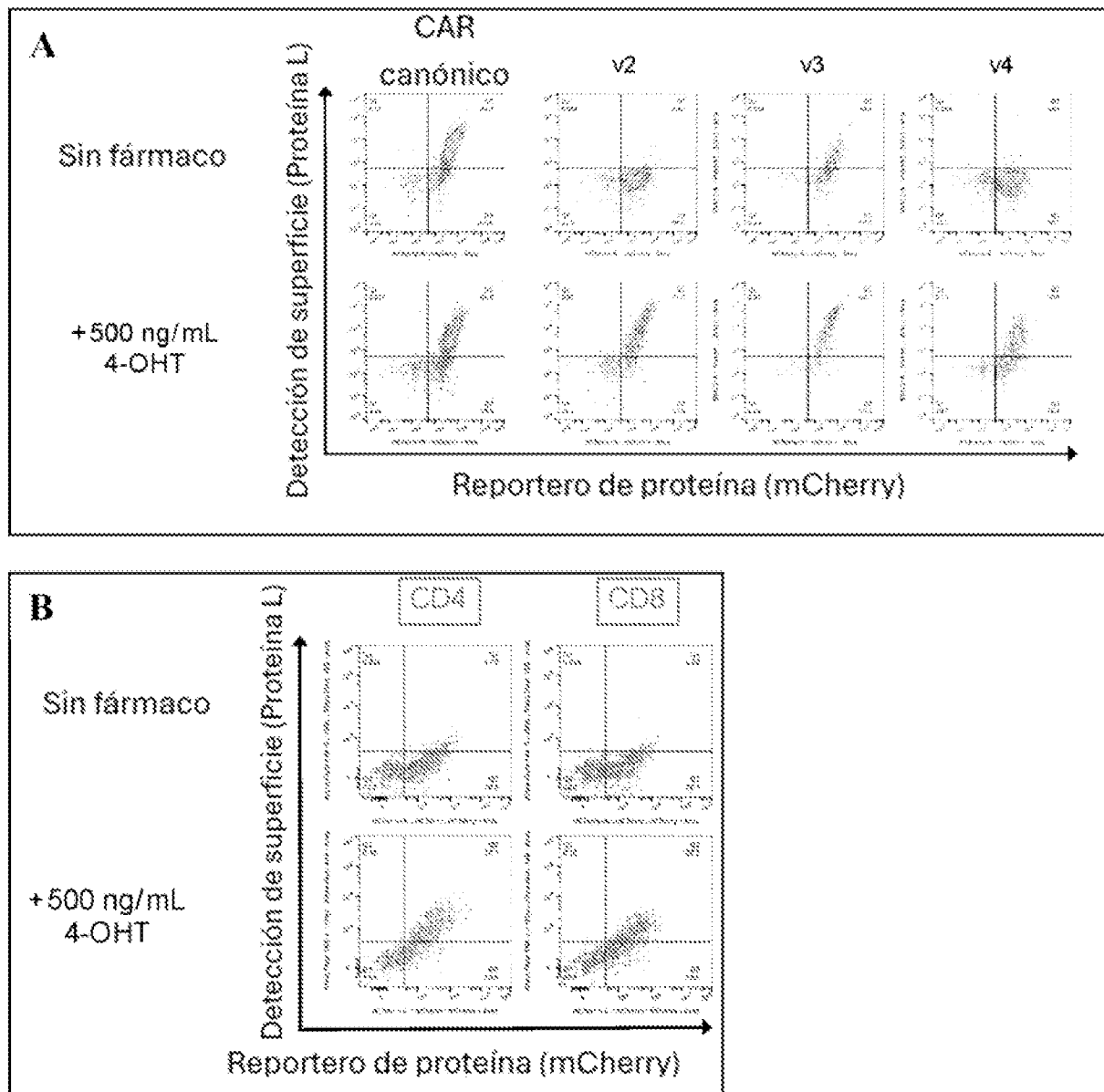


Figura 2

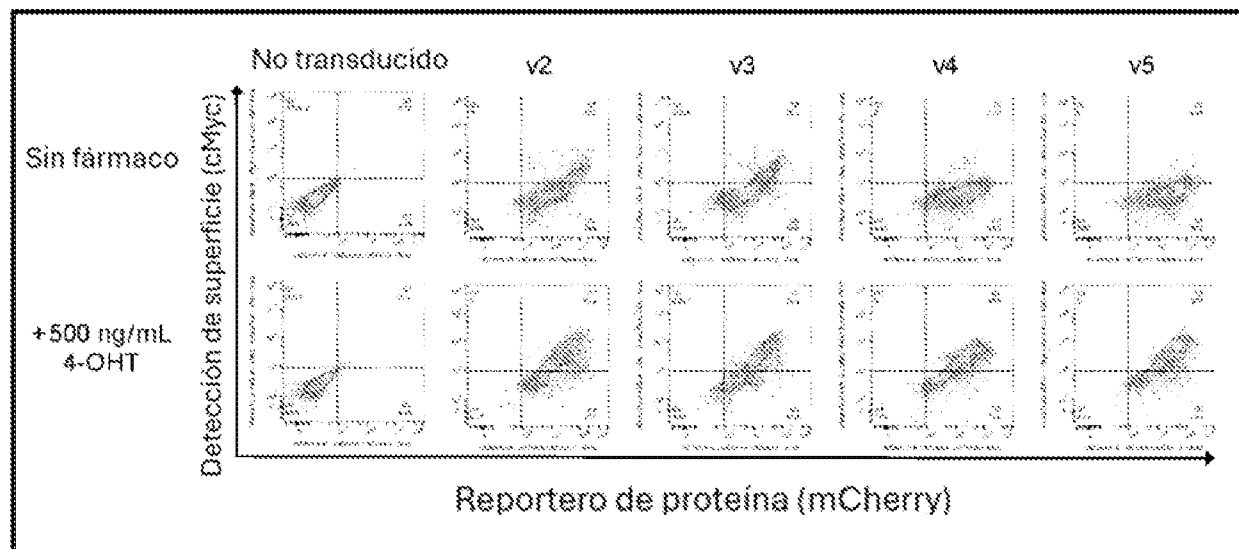


Figura 3

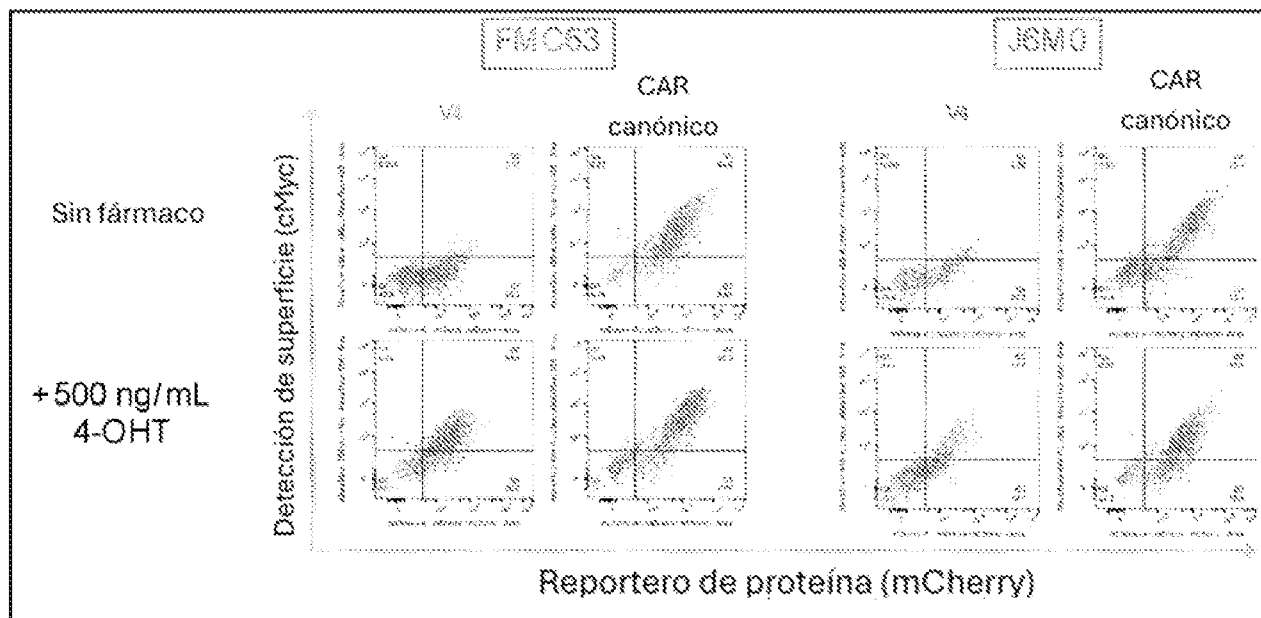
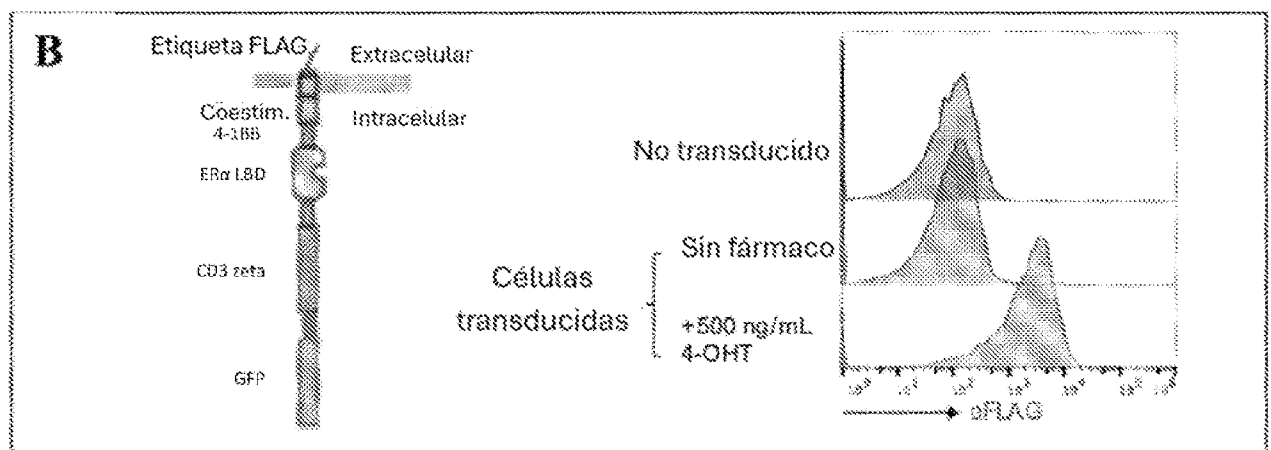
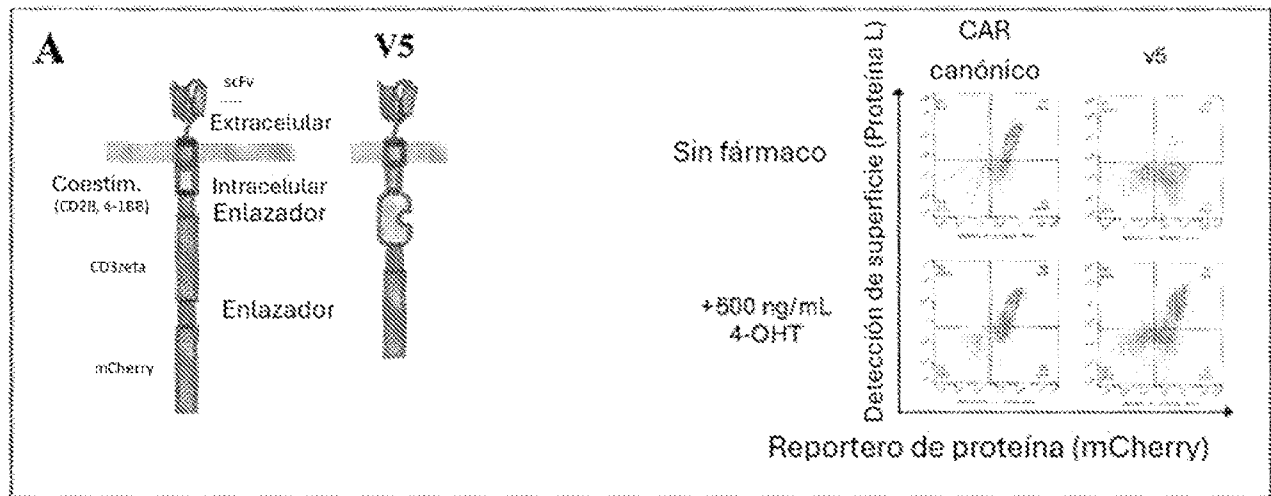


Figura 4

Figura 5



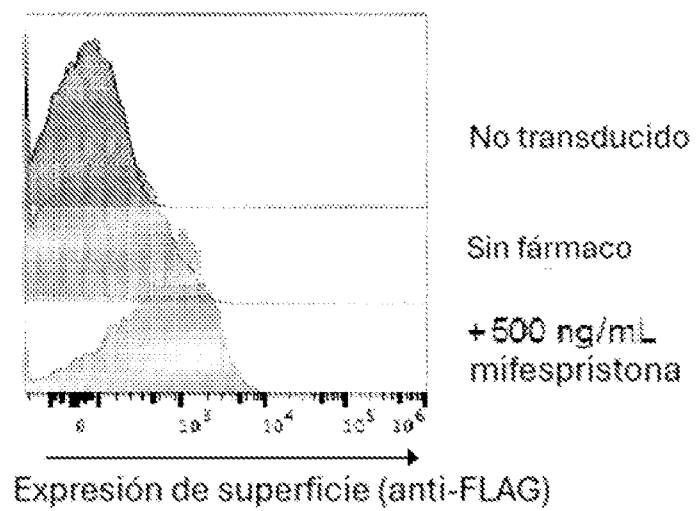


FIG. 6

Activación de células T después del cocultivo durante la noche

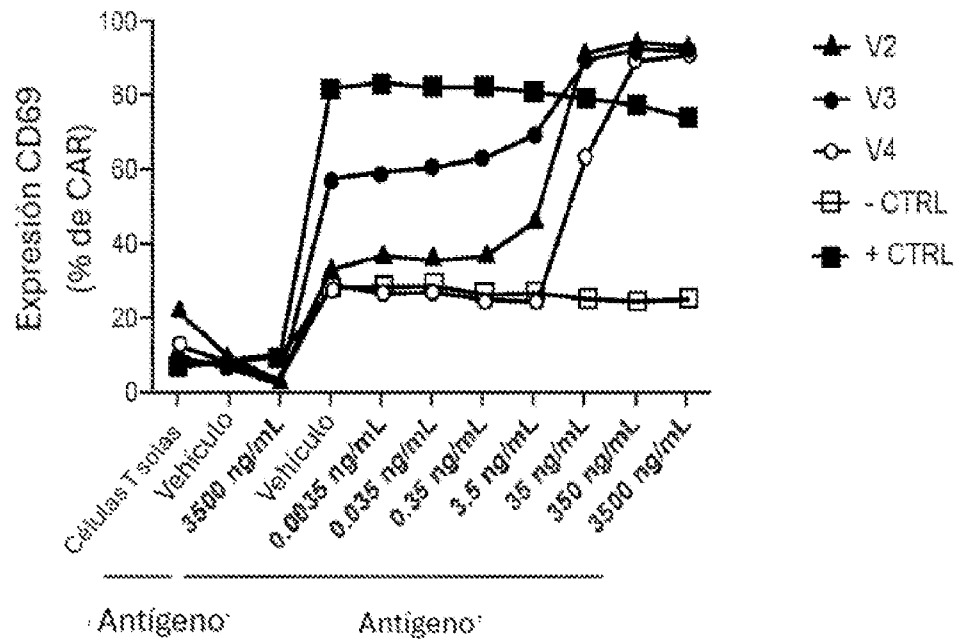


FIG. 7A

Producción IFN γ después del cocultivo durante la noche

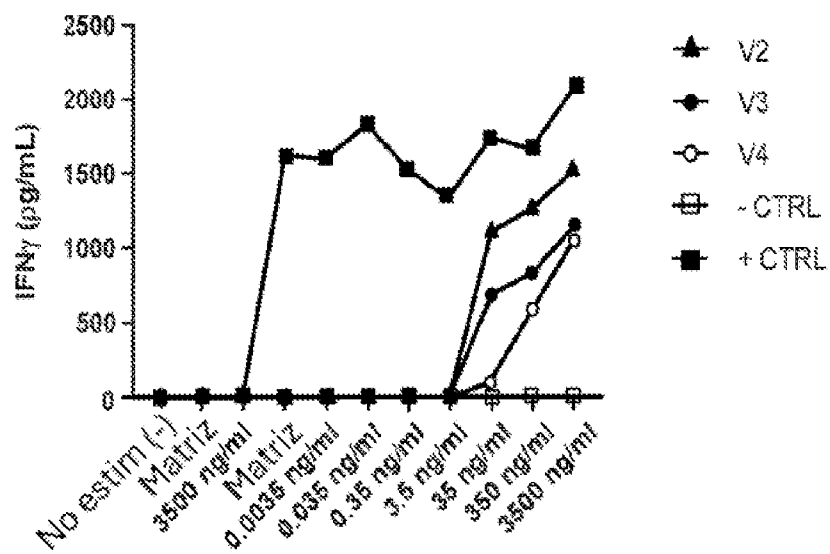


FIG. 7B

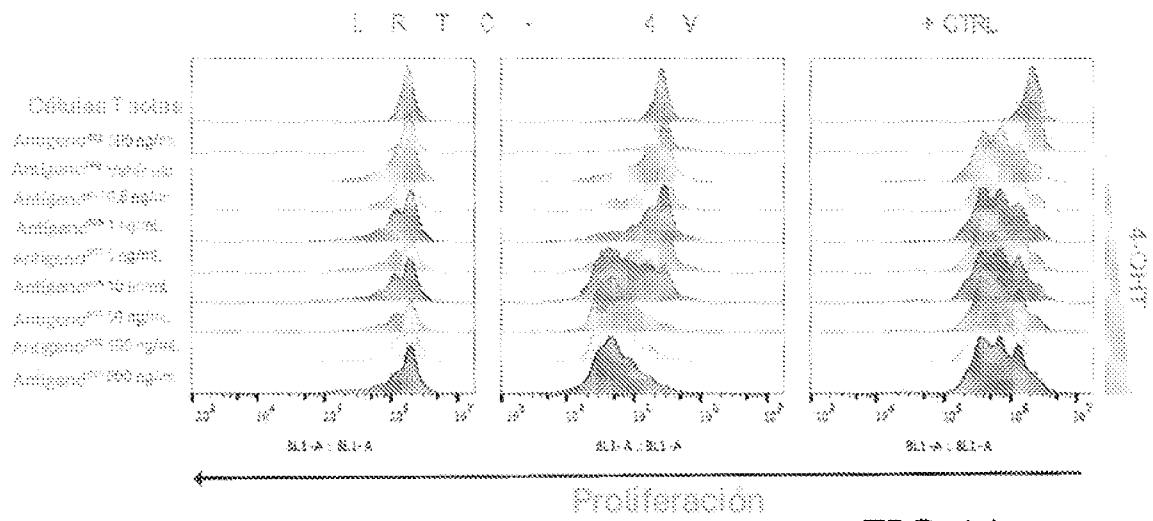


FIG. 8A

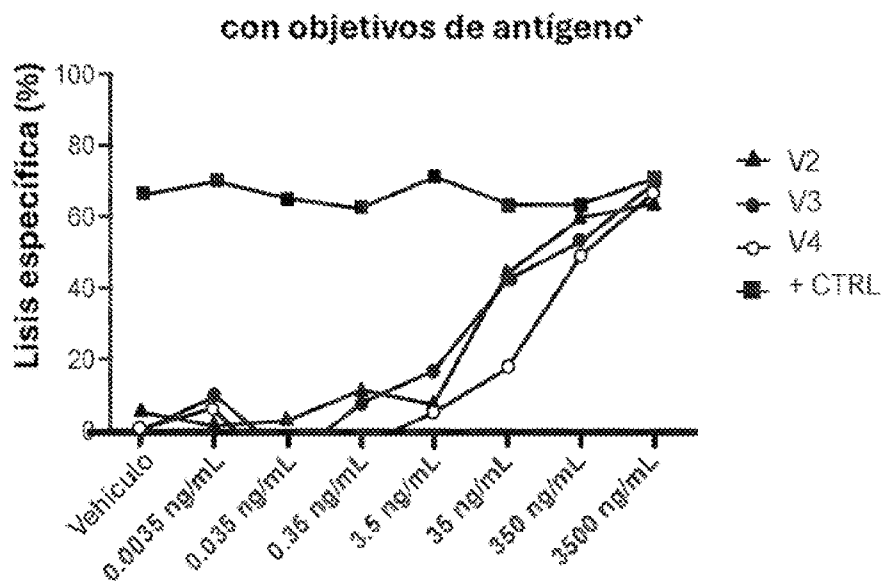


FIG. 8B

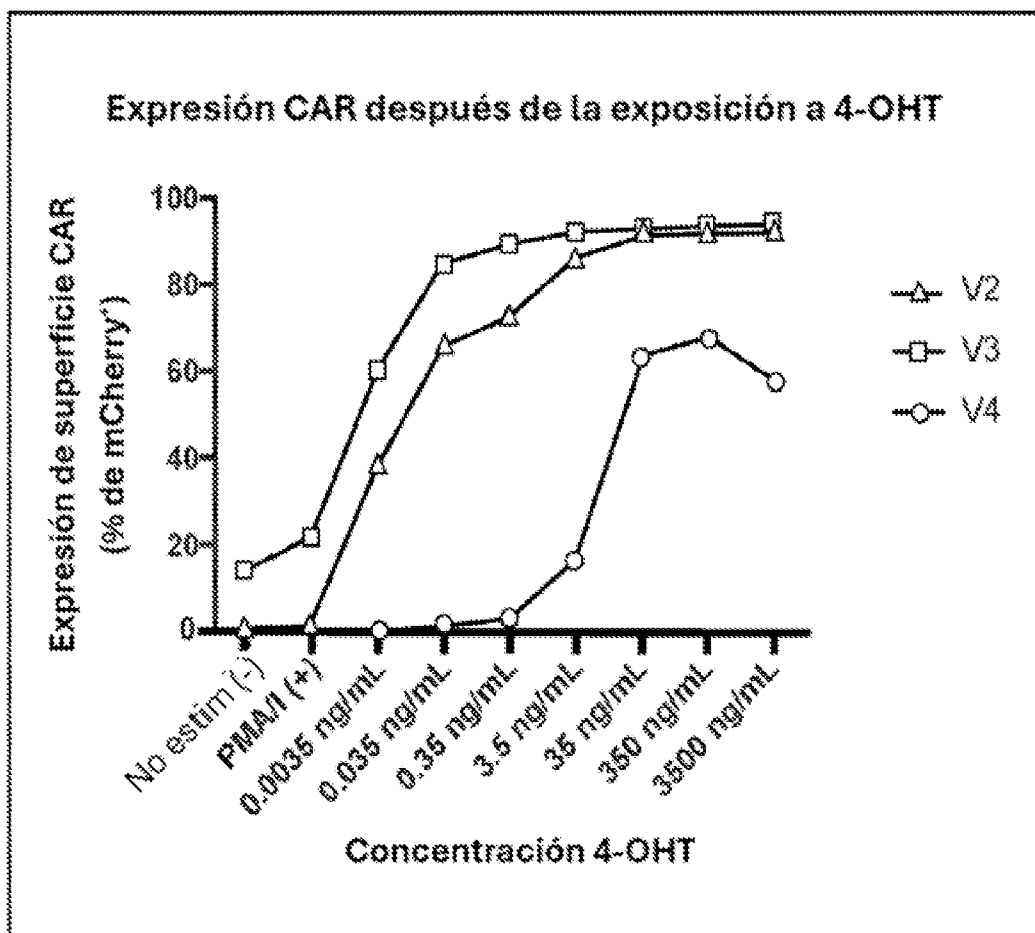


FIG. 9

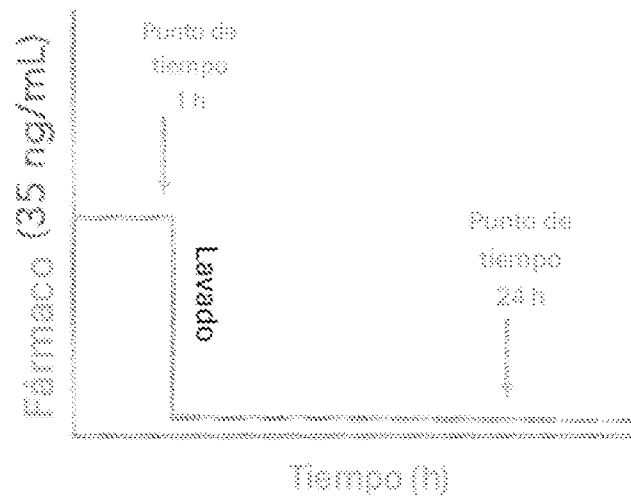


FIG. 10A

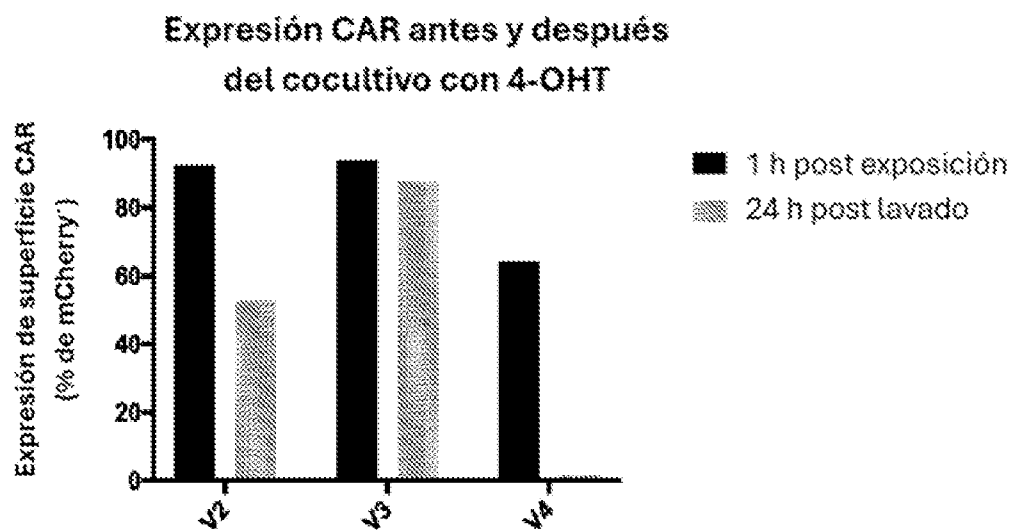


FIG. 10B

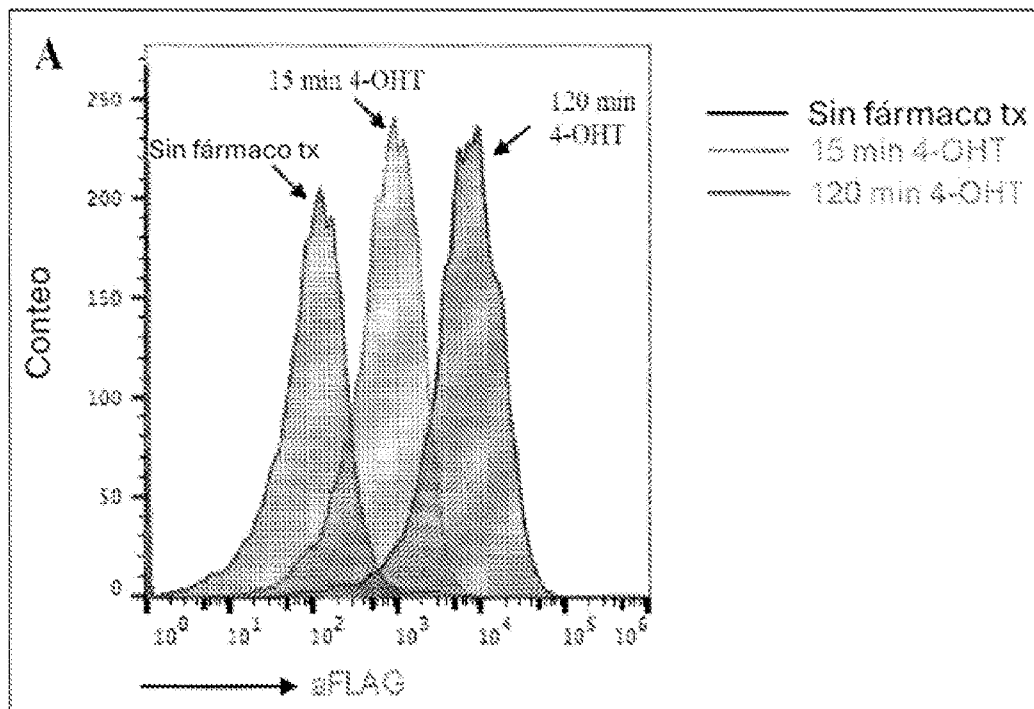


FIG. 11A

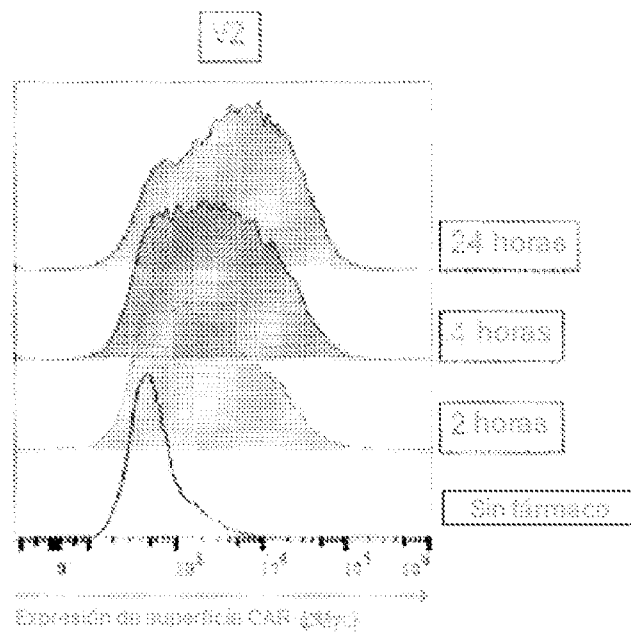


FIG. 11B

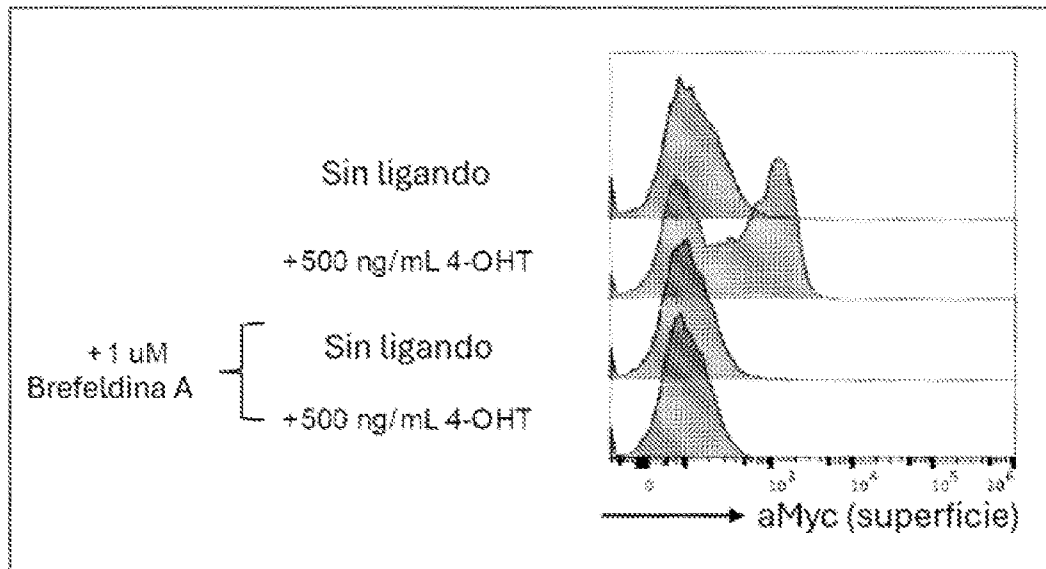


FIG. 12

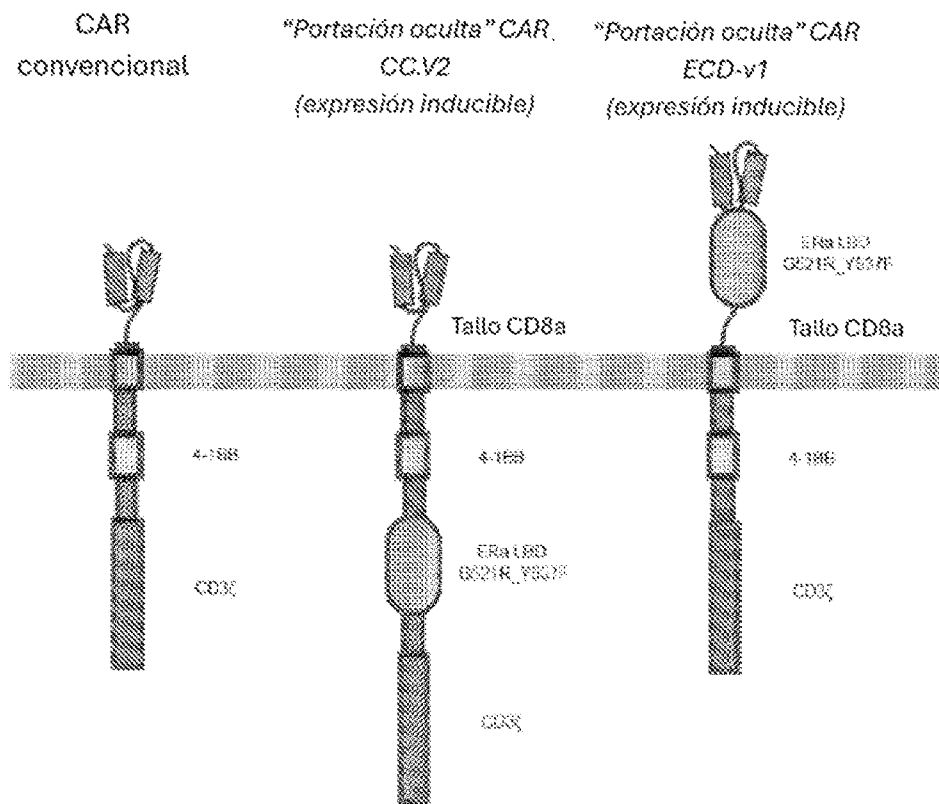
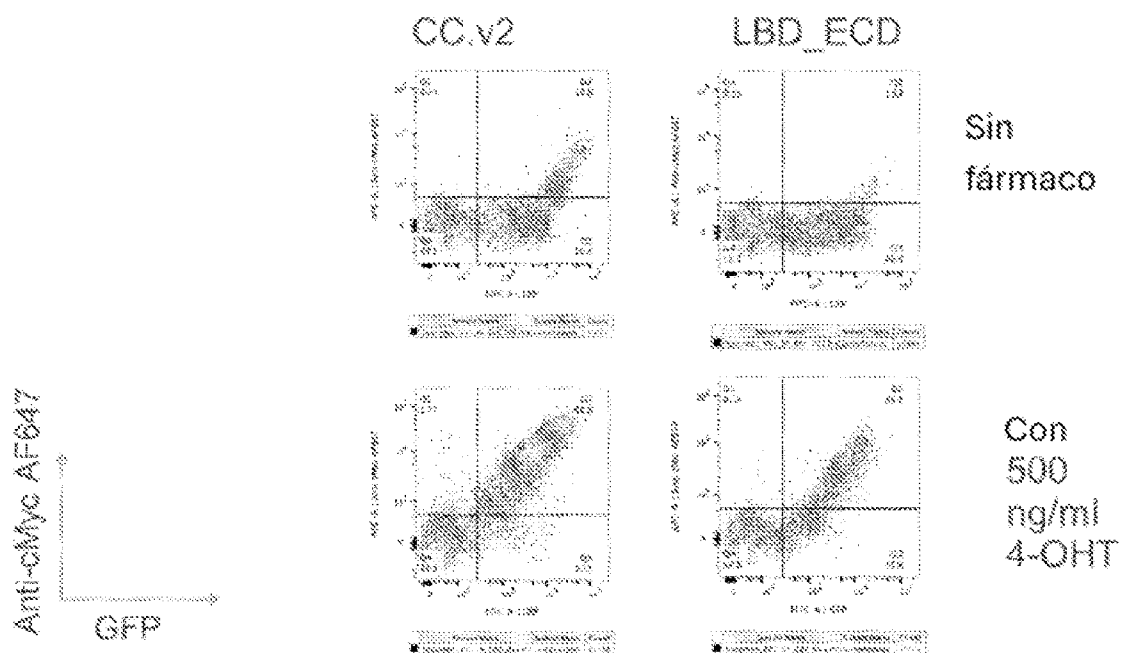


FIG. 13



(FMC63 mostrado. D3369, iCDL_20170810)

Figura 14

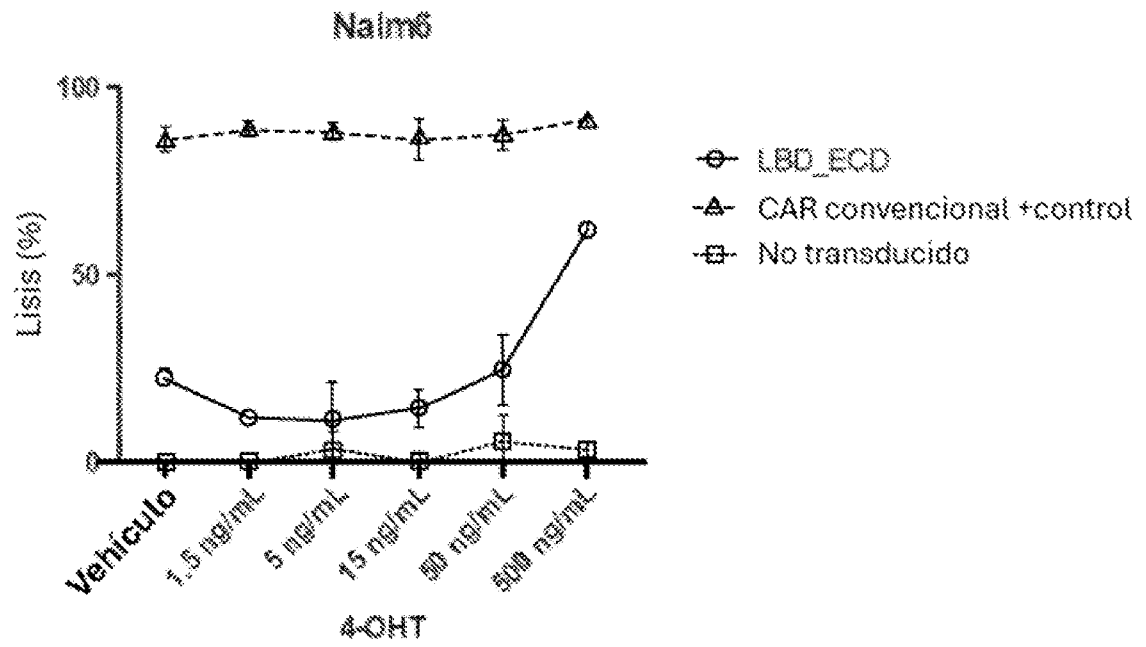


Figura 15

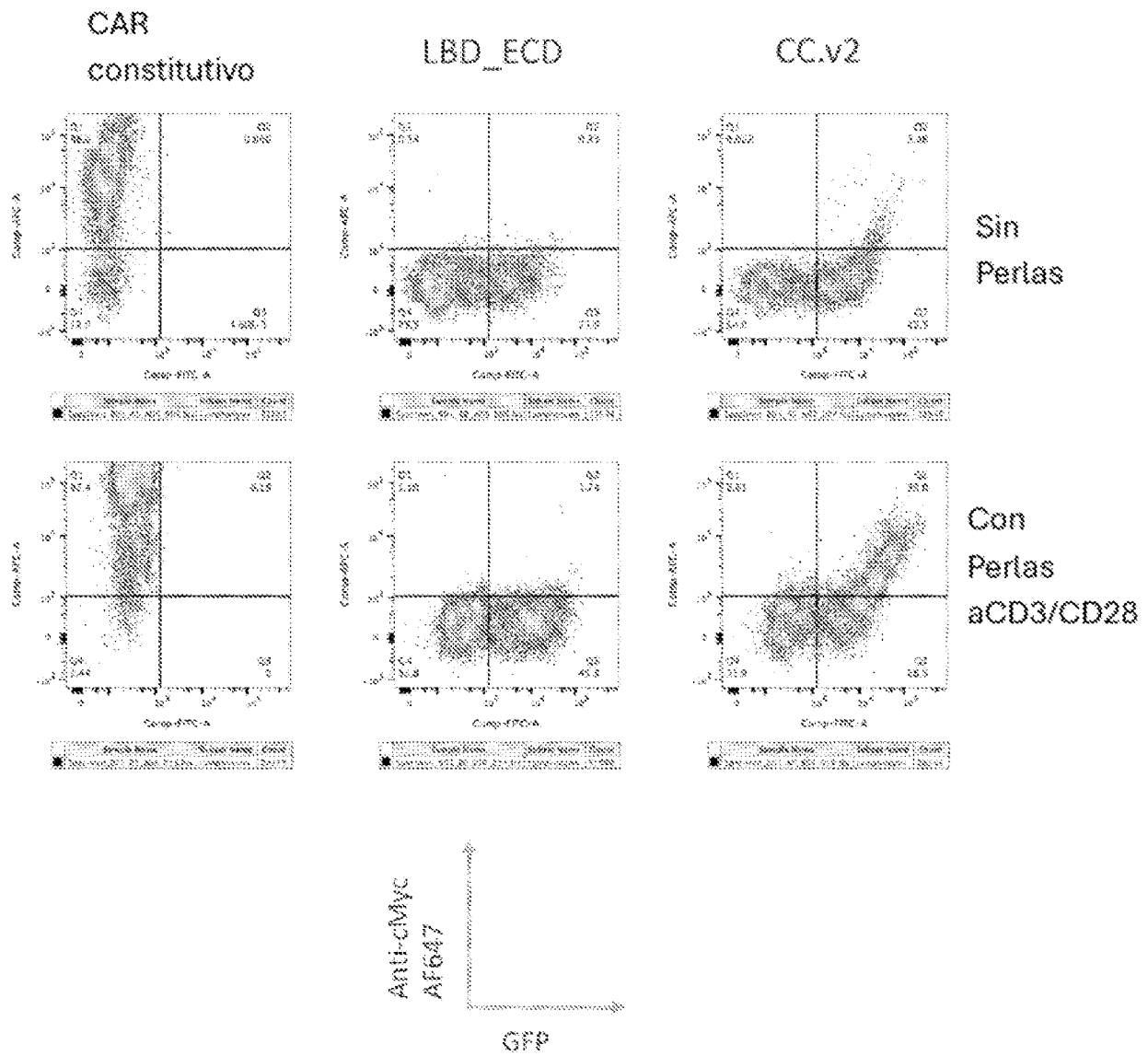


Figura 16

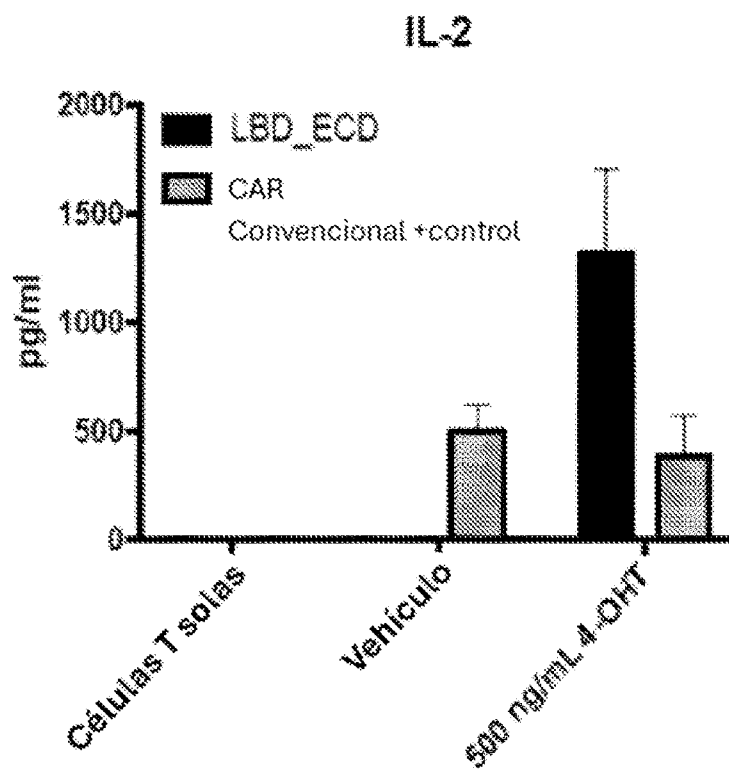


FIG. 17