



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 910 008**

⑮ Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2015 PCT/GB2015/052494**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16030691**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2015 E 15757558 (0)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.01.2022 EP 3185875**

④ Título: **Sistema de señalización**

⑩ Prioridad:

29.08.2014 GB 201415347

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.05.2022

⑬ Titular/es:

AUTOLUS LIMITED (100.0%)
The MediaWorks, 191 Wood Lane
London W12 7FP, GB

⑭ Inventor/es:

PULÉ, MARTIN;
CORDOBA, SHAUN y
KONG, KHAI

⑭ Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 910 008 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

Sistema de señalización

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con un sistema de señalización de receptores antigenéricos químéricos.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Tradicionalmente se han generado células T específicas de antígenos por la expansión selectiva de células T de sangre periférica, específicas en forma nativa para el antígeno objetivo. Sin embargo, es difícil y muy a menudo imposible seleccionar y expandir una gran cantidad de células T específicas para la mayor parte de los antígenos cancerosos. La terapia génica con vectores de integración provee una solución para este problema dado que la expresión transgénica del Receptor Antigénico Químérico (CAR) permite la generación de una gran cantidad de células T específicas para cualquier antígeno superficial por la transducción de vectores virales *ex vivo* de una población general de células T de sangre periférica.

Los receptores antigenéricos químéricos son proteínas que injertan la especificidad de un anticuerpo monoclonal (mAb) en la función efectora de una célula T. Su forma usual es la de una proteína de dominio transmembranal tipo I con un extremo amino terminal de reconocimiento de antígenos, un espaciador y un dominio transmembranal, conectados en su totalidad a un endodomino compuesto que transmite señales de supervivencia y activación de células T (ver Figura 1A).

Las formas más comunes de estas moléculas son fusiones de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales que reconocen un antígeno objetivo, fusionados mediante un espaciador y un dominio transmembranal a un endodomino de señalización. Estas moléculas resultan en la activación de la célula T en respuesta al reconocimiento por parte del scFv de su objetivo. Cuando las células T expresan este CAR, reconocen y eliminan las células objetivo que expresan el antígeno objetivo. Se han desarrollado varios CAR contra antígenos asociados a tumores, y las estrategias de transferencia adoptiva que utilizan estas células T que expresan CAR actualmente se encuentran en pruebas clínicas para el tratamiento de diversos cánceres.

25 Se ha informado de una serie de toxicidades a partir de los estudios de CAR, y existen toxicidades teóricas adicionales. Estas toxicidades incluyen toxicidad inmunológica ocasionada por la activación intensa sostenida de las células T con CAR, lo que resulta en un síndrome de activación de macrófagos (MAS) y toxicidad “específica del objetivo, inespecífica del tumor”, es decir, el reconocimiento del antígeno objetivo en tejidos normales.

30 Se presume que se da lugar a MAS por la activación persistente estimulada por antígenos y la proliferación de células T, lo cual a su vez libera copiosas citocinas inflamatorias, lo que conduce a la hiperactivación de macrófagos y un ciclo de prealimentación de la activación inmune. Un gran pico en la IL-6 sérica es característico, y el síndrome puede tener como resultado una severa dolencia sistémica que requiere admisión a ICU.

35 La toxicidad específica del objetivo, inespecífica del tumor se ha informado con otros CAR, por ejemplo, un grupo de pacientes, tratados con un CAR contra el antígeno de carcinoma de células renales CAIX, desarrolló una toxicidad biliar inesperada y limitante del tratamiento. Se ha informado de dos fatalidades con los estudios de CAR: un paciente falleció de síndrome de dificultad respiratoria, lo cual ocurrió inmediatamente posterior a la infusión de una gran dosis de células T con CAR anti-ERBB2 de 3a generación, y un paciente más falleció en un estudio diferente después de una posible tormenta de citocinas, después del tratamiento de CLL con un CAR anti-CD19 de segunda generación.

40 Estas toxicidades son muy difíciles de predecir, incluso con estudios detallados en animales o con trabajos en primates no humanos. Fundamentalmente, a diferencia de las moléculas pequeñas y los biológicos, las células T con CAR no tienen una vida media y su administración no puede cesar y esperar a que el agente se desintegre o llegue a excretarse. Las células T con CAR son autónomas y pueden injertarse y proliferar. La toxicidad, por lo tanto, puede ser progresiva y fulminante.

45 Los genes suicidas son elementos expresados genéticamente, los cuales pueden destruir condicionalmente las células que los expresan. Los ejemplos incluyen la timidina cinasa del virus del herpes simple, la cual hace a las células susceptibles al Ganciclovir, la Caspasa 9 inducible, la cual vuelve a las células susceptibles a un homodímerizador molecular pequeño, y CD20 y RQR8, que vuelven a las células susceptibles al Rituximab.

50 Esta tecnología agrega cierta cantidad de seguridad a la terapia con células T con CAR, sin embargo, hay limitaciones. En primer lugar, es una estrategia binaria en donde todas las células T con CAR se destruyen con la adición del agente suicida. Además, los agentes terapéuticos medicinales a menudo tienen una ventana terapéutica. Con un gen suicida, la potencia del producto no puede afinarse de tal forma que pueda lograrse una eficacia con toxicidad tolerable. En

segundo lugar, no está claro si un gen suicida podría ayudar con una parte de las toxicidades inmunes arriba descritas: por ejemplo, para cuando se haya desencadenado un síndrome de activación de macrófagos, puede ya no necesitarse que las células T con CAR se perpetúen y el gen suicida podría ya no ser útil. Los síndromes de liberación de citocinas más agudos probablemente ocurren demasiado rápido para que el gen suicida funcione.

5 De esta manera, existe la necesidad de métodos alternativos para controlar las células T con CAR que no se asocian con las desventajas y problemas arriba mencionados.

10 El documento WO 2014/127261 A1 describe un receptor antigénico químérico (CAR) heterodimérico, condicionalmente activo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el CAR y células genéticamente modificadas para producir el CAR. En los sistemas descritos en el documento WO 2014/127261 A1 la activación de CAR solo se produce en presencia de un agente dimerizante.

Luckner et al., 2007, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 368(3) describe el mecanismo de la inducción de TetR por Tip, un péptido de 16 restos que imita el antibiótico Tetraciclina.

15 Casucci et al., 2012, *Blood*, Vol.- 120(21) describe una estrategia para la orientación segura de la variante 6 de CD44 a través de la coexpresión de un gen suicida en las células T con CAR modificado para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (AML) y mieloma múltiple (MM).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 **Figura 1** – a) Diagrama esquemático que ilustra un CAR clásico. (b) a (d): Diferentes generaciones y permutaciones de endodominios de CAR: (b) los diseños iniciales transmitieron señales de ITAM solas a través del endodomino FcεR1-γ o CD3ζ, mientras los diseños posteriores transmitieron (c) una adicional o (d) dos señales coestimuladoras en el mismo endodomino compuesto.

Figura 2 - Estructuras de TetR y TiP. (a) secuencia de TiP asociado en el extremo amino terminal de una proteína arbitraria, (b) estructura derivada por cristalografía de TiP en interacción con TetR (de PDB 2NS8 y Luckner et al (J. Mol. Biol. 368, 780–790 (2007)). TiP puede verse enganchado en profundidad dentro del homodímero TetR en asociación con muchos de los residuos con los que se asocia la tetraciclina.

25 **Figura 3** - (a) Un componente receptor que abarca la membrana comprende un dominio extracelular de unión a antígenos, un dominio transmembranal y un enlazador intracelular a TetR. Una molécula separada, el componente de señalización, comprende una proteína intracelular que se genera por la fusión de TiP a uno o varios dominios de señalización de células T. En ausencia de tetraciclina o análogos de tetraciclina, los componentes receptores y de señalización interactúan y, en presencia del antígeno afín, el sistema envía señales, (b) En presencia de tetraciclina o análogos de tetraciclina, el TiP se desplaza del TetR y el receptor no puede transmitir señales, incluso en presencia del antígeno afín.

Figura 4 - Dominio enlazador intracelular derivado de CD4.

35 **Figura 5** - Construcción de prueba con eGFP para demostrar la función del sistema, (a) una construcción bicistrónica expresada como un solo transcrito que se autoescinde en el sitio 2A para proveer: TiP fusionado a eGFP, y un CAR con TetR como su endodomino. (b) microfotografía fluorescente de células SupT1 que expresan esta construcción en ausencia de tetraciclina. La fluorescencia de eGFP puede verse claramente en la membrana celular, (c) microfotografía fluorescente de las mismas células pero ahora en presencia de tetraciclina. Aquí, la eGFP es citoplásica, lo que muestra que la tetraciclina ha desplazado a TiP.

40 **Figura 6** - Construcción inicial de TetCAR y control. (a) una construcción bicistrónica expresada como un solo transcrito que se autoescinde en el sitio 2A para proveer: un componente de señalización que comprende TiP fusionado mediante un enlazador flexible al endodomino de CD3-zeta, y un componente receptor que comprende un CD33 que reconoce a scFv, un espaciador derivado del dominio Fc de IgG1, un dominio transmembranal e intracelular derivado de CD4, y TetR. (b) también se construyó un control que fue idéntico, excepto que TiP estaba ausente del componente de señalización. (c) se muestra la secuencia de aminoácidos acotada del TetCAR básico.

45 **Figura 7** - Función de la construcción de TetR inicial en comparación con el control, (a) TetCAR se expresó en células T BW5. Estas células T se desafiaron con células SupT1 de tipo silvestre o células SupT1 diseñadas para expresar CD33 en ausencia de tetraciclina o en presencia de concentraciones crecientes de tetraciclina. Las células T desafiadadas con células SupT1 de tipo silvestre no se activan en presencia o ausencia de tetraciclina, y las células T desafiadadas con células SupT1 que expresan CD33 se activan en ausencia de tetraciclina, pero la activación se inhibe rápidamente en presencia de tetraciclina con la activación inhibida por completo en presencia de tetraciclina 100 nM, (b) Un TetCAR de control, que carecía del dominio TiP, se transdujo en BW5. Una vez más, estas células T se desafiaron con células SupT1 de tipo silvestre o células SupT1 diseñadas para expresar CD33 en ausencia o en

presencia de una concentración creciente de tetraciclina. La falta del elemento TiP en el componente de señalización tuvo como resultado la falta de señalización en cualquier condición.

Figura 8 – tetCAR con dominio tetR dual. tetR se expresa como cadena sencilla con dos TetR asociados en conjunto. Si se utilizan dominios tetR con afinidad diferente por la tetraciclina (y, por tanto, TiP), la cinética del desplazamiento mediado por tetraciclina de TiP puede modular los niveles de señalización.

Figura 9 – Un sistema de señalización de tetCAR que utiliza una pluralidad de componentes de señalización que contienen endodominiós únicos. Un solo CAR se expresa con muchos componentes de señalización diferentes, cuya totalidad comprende TiP en su extremo amino terminal pero un dominio de señalización individual diferente, en contraste con un dominio de señalización compuesto. Estos interactúan en forma aleatoria con el componente receptor. La falta de interacción estérica entre los diferentes dominios de señalización y sus segundos mensajeros mejora su función.

Figura 10 – Un sistema de señalización de tetCAR que utiliza una pluralidad de componentes de señalización que contienen endodominiós únicos y diferentes dominios TiP. Cada componente de señalización se comprende de un dominio de señalización individual. Cada componente de señalización también se comprende de un TiP, sin embargo, cada TiP tiene diferentes afinidades al dominio TetR. Por tanto, la estequiometría de las interacciones entre el CAR y los dominios de señalización puede variarse. En el ejemplo mostrado, el sistema de señalización se construye de tal forma que OX40 > CD3Zeta > CD28.

Figura 11 - Un sistema de señalización de tetCAR que utiliza una pluralidad de componentes receptores y una pluralidad de componentes de señalización, cada componente de señalización con un solo endodominió.

Figura 12 – Señalización por TetCAR en células primarias. (a) Diferentes construcciones probadas: (i) CAR clásico, (ii) tetCAR, (iii) tetCAR de control donde se ha eliminado TiP, (b) células SupT1.CD19 sin transducir y teñidas para CD19, (c) células T sin transducir y células T transducidas con las diferentes construcciones de CAR teñidas con anticuerpo anti-Fc.

Figura 13 - Liberación de interferón gamma a partir de células T sin transducir y células T transducidas con las diferentes construcciones de CAR desafiadas ((i) CAR clásico de primera generación, (ii) tetCAR y (iii) tetCAR de control), con células SupT1, células SupT1.CD19 en diferentes concentraciones de tetraciclina.

Figura 14 – Eliminación de células objetivo. Un ensayo de liberación de cromo se utilizó para demostrar la eliminación de células objetivo (SupT1.CD19) en ausencia de tetraciclina. Clave: (i) - CAR regular, (ii) – tetCAR, (iii) - tetCAR de control (sin TiP en endodominió).

30 SUMARIO DE LOS ASPECTOS DE LA INVENCIÓN

Los presentes inventores han encontrado que es posible separar los componentes de reconocimiento de antígenos y de señalización de un CAR para producir un sistema en el cual la señalización puede inhibirse/terminarse rápidamente, a pesar de la unión continua del antígeno a un componente de reconocimiento de antígenos del sistema de CAR. Esta inhibición de la señalización ocurre en presencia de un agente, tal como una molécula pequeña, la cual inhibe la colocalización e interacción que de otro modo podrían presentarse entre un componente extracelular de unión a antígenos (referido en el presente documento como el componente receptor) y un componente de señalización intracelular del CAR.

La presente divulgación proporciona un sistema de receptores antigenéricos químéricos (CAR) que comprende:

- 40 (i) un componente receptor que comprende un dominio de unión a antígenos, un dominio transmembranal y un primer dominio de unión; y
- (ii) un componente de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización y un segundo dominio de unión que se une específicamente al primer dominio de unión del componente receptor;

en donde la unión del primer y segundo dominios de unión se desorganiza por la presencia de un agente, de tal forma que, en ausencia del agente, el componente receptor y el componente de señalización se heterodimerizan y la unión del dominio de unión a antígenos al antígeno tiene como resultado la señalización a través del dominio de señalización, en tanto que, en presencia del agente, el componente receptor y el componente de señalización no se heterodimerizan y la unión del dominio de unión a antígenos al antígeno no tiene como resultado la señalización a través del dominio de señalización, en donde el primer dominio de unión comprende la Proteína Represora de Tet (TetR) y el segundo dominio de unión comprende el péptido inductor de la Transcripción (TiP); o en donde el primer dominio de unión comprende TiP y el segundo dominio de unión comprende TetR; y el agente es tetraciclina, doxiciclina o minociclina o un análogo de las mismas.

El componente receptor puede comprender un enlazador entre el dominio transmembranal y el primer dominio de unión.

El enlazador puede comprender o consistir en la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 3.

5 El primer dominio de unión comprende la Proteína Represora de Tet (TetR) y el segundo dominio de unión comprende el Péptido inductor de TetR (TiP, como se describe por Klotzsche *et al*; *The Journal of biological chemistry*; 2005; 280(26); 24591-9) (TiP), o viceversa. El agente es tetraciclina, doxiciclina o minociclina, o un análogo de las mismas.

El componente receptor puede comprender dos primeros dominios de unión, los cuales son dominios TetR. Los dos dominios TetR pueden separarse por un enlazador. Cada dominio TetR puede tener una afinidad diferente por el agente.

10 El sistema de CAR desvelado en el presente documento puede comprender componentes receptores múltiples, y cada uno reconoce un antígeno diferente.

Los primeros dominios de unión de los componentes receptores múltiples pueden diferir en la unión al segundo dominio de unión del componente de señalización, de tal forma que cada antígeno propague diferentes potencias de señalización.

15 Los primeros dominios de unión de los componentes receptores múltiples pueden diferir en la unión al agente, de tal forma que cada antígeno propague diferentes potencias de señalización en presencia del agente.

El dominio de señalización del componente de señalización puede comprender un solo endodomino seleccionado del endodomino de CD3 Zeta, endodomino de CD28, endodomino de 41BB y endodomino de OX40.

20 El dominio de señalización del componente de señalización puede comprender por lo menos uno del endodomino de CD3 Zeta, endodomino de CD28, endodomino de 41BB y endodomino de OX40.

El sistema de CAR desvelado en el presente documento puede comprender una pluralidad de componentes de señalización, y cada uno comprende un dominio de señalización y un segundo dominio de unión, en donde los segundos dominios de unión reconocen, cada uno, el mismo primer dominio de unión del componente receptor, pero los dominios de señalización comprenden diferentes endodomios.

25 La pluralidad de componentes de señalización puede comprender una pluralidad de segundos dominios de unión, cada uno de los cuales reconoce independientemente el primer dominio de unión del componente receptor con diferentes afinidades.

30 Se describe en el presente documento un componente receptor adecuado para su uso en el sistema de CAR de la divulgación, el cual comprende un dominio de unión a antígenos, un dominio transmembranal y un primer dominio de unión.

Se describe en el presente documento un componente de señalización adecuado para su uso en el sistema de CAR la divulgación, el cual comprende un dominio de señalización y un segundo dominio de unión.

Se describe en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica el componente receptor.

Se describe en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica el componente de señalización.

35 La presente divulgación proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un sistema de CAR de la divulgación, en donde el componente receptor y componente de señalización se coexpresan por medio de un péptido de autoescisión, el cual se escinde entre el componente receptor y el componente de señalización después de la traducción.

40 La presente divulgación proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación.

La presente divulgación proporciona un vector retroviral, un vector lentiviral o un transposón que comprende un vector de acuerdo con la divulgación.

La presente divulgación proporciona una célula T o célula NK que expresa un sistema de señalización de CAR de acuerdo con la divulgación.

La célula T o célula NK puede comprender un ácido nucleico de acuerdo con la divulgación, o un vector de acuerdo con la divulgación.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células T o células NK, de acuerdo con la divulgación.

5 La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica, de acuerdo con la divulgación para su uso en un método para tratar cáncer.

El método puede comprender las siguientes etapas:

- (i) aislamiento de una muestra que contiene células T o NK;
- (ii) transducción o transfección de las células T o NK con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación, o un vector de acuerdo con la divulgación; y
- (iii) administrar las células T o células NK de (ii) a un sujeto.

10 El método puede implicar la administración de células T/células NK a un sujeto, y estas células T/células NK se han aislado previamente a partir del sujeto y se han transducido/transfectado con una secuencia de ácido nucleico de la divulgación, o un vector de la divulgación.

15 El método puede implicar el monitoreo de la actividad tóxica en el sujeto, y puede comprender la etapa de administrar un agente para su uso en el sistema de CAR de la divulgación al sujeto, para reducir los efectos tóxicos adversos.

El método puede implicar el monitoreo de la progresión de la enfermedad y/o el monitoreo de la actividad tóxica en el sujeto, y puede comprender la etapa de administrar un agente para su uso en el sistema de CAR de la divulgación al sujeto, para proporcionar niveles aceptables de progresión de enfermedad y/o actividad tóxica.

20 La presente divulgación proporciona un equipo que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la divulgación, o un vector de acuerdo con la divulgación.

La presente divulgación se relaciona con un método para producir una célula T o NK de acuerdo con la divulgación, el cual comprende la etapa de introducir una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación, o el vector de acuerdo con la divulgación, en una célula T o NK.

25 La célula T o NK puede ser de una muestra aislada a partir de un sujeto.

Se describe en el presente documento un método para inhibir el sistema de CAR de acuerdo con la divulgación en un sujeto, el cual comprende una célula T o NK de acuerdo con la divulgación y el método comprende la etapa de administrar el agente al sujeto.

30 La presente divulgación por lo tanto proporciona un sistema de CAR en el cual la señalización puede inhibirse en presencia de un agente, por ejemplo, una molécula pequeña, lo cual impide la colocación del componente receptor y componente de señalización. Esto permite que la señalización por CAR y, de esta manera, la potencia de las células con CAR, se terminen de manera reversible en una forma controlable, con el fin de evitar los efectos tóxicos potenciales asociados con la señalización por CAR constante. Además, el presente sistema también permite que la potencia de las células con CAR se controle farmacológicamente, y se afine a un equilibrio aceptable entre lograr el efecto terapéutico deseado y evitar toxicidades indeseables.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

RECEPTORES ANTIGÉNICOS QUIMÉRICOS (CAR)

Los CAR clásicos, que se muestran esquemáticamente en la Figura 1, son proteínas transmembranales quiméricas tipo I que conectan un dominio extracelular de reconocimiento de antígenos (porción de unión) a un dominio intracelular de señalización (endodomino). La porción de unión típicamente es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal (mAb), pero puede basarse en otros formatos que comprenden un sitio de unión a antígenos tipo anticuerpo. Un dominio espaciador puede ser necesario para aislar la porción de unión de la membrana y para permitirle una orientación adecuada. Un dominio espaciador común utilizado es el Fc de IgG1. Espaciadores más compactos pueden ser suficientes, por ejemplo, el tallo de CD8α e incluso justamente la bisagra de IgG1 sola, lo que depende del antígeno. Un dominio transmembranal ancla la proteína en la membrana celular y conecta el espaciador al endodomino.

40 Los primeros diseños de CAR tenían endodomios derivados de las partes intracelulares de la cadena y del FcεR1 o

CD3 ζ . En consecuencia, estos receptores de primera generación transmitían la señal inmunológica 1, lo cual era suficiente para activar la eliminación por parte de las células T de las células objetivo afines, pero no podía activar por completo a la célula T para proliferar y sobrevivir. Para superar esta limitación, se han construido endodominios compuestos: la fusión de la parte intracelular de una molécula coestimuladora de células T a la de CD3 ζ resulta en

5 receptores de segunda generación que pueden transmitir una señal de activación y coestimuladora simultáneamente después del reconocimiento de antígenos. El dominio coestimulador más comúnmente utilizado es el de CD28. Este suministra la señal coestimuladora más potente, en particular la señal inmunológica 2, la cual desencadena la 10 proliferación de células T. También se han descrito algunos receptores que incluyen endodominios de la familia de receptores del TNF, tales como los estrechamente relacionados OX40 y 41BB, los cuales transmiten señales de supervivencia. Actualmente se han descrito CAR de tercera generación incluso más potentes, los cuales tienen 15 endodominios capaces de transmitir señales de activación, proliferación y supervivencia.

Los ácidos nucleicos que codifican CAR pueden transferirse a células T al utilizar, por ejemplo, vectores retrovirales. En esta forma, puede generarse un gran número de células T específicas de antígenos para transferencia celular adoptiva. Cuando el CAR se une al antígeno objetivo, esto resulta en la transmisión de una señal de activación a la 15 célula T en que se expresa. De esta manera, el CAR dirige la especificidad y citotoxicidad de la célula T hacia las células que expresan el antígeno establecido como objetivo.

20 La presente divulgación se relaciona con un sistema de CAR en el cual el dominio de reconocimiento de antígenos/de unión a antígenos y dominio transmembranal se proporcionan en una primera molécula (denominada en el presente documento 'componente receptor'), la cual se localiza en la membrana celular. El dominio de señalización intracelular se proporciona en una segunda molécula intracelular (denominada en el presente documento 'componente de señalización').

25 De gran importancia, el componente receptor comprende un primer dominio de unión, y el componente de señalización comprende un segundo dominio de unión, el cual se une específicamente al primer dominio de unión del componente receptor. De esta manera, la unión del primer dominio de unión al segundo dominio de unión da lugar a la heterodimerización y colocalización del componente receptor y el componente de señalización. Cuando el antígeno se une al dominio de unión a antígenos del componente receptor, hay señalización a través del componente de señalización.

30 El primer o segundo dominio de unión también es capaz de unirse a un agente adicional, además del dominio de unión recíproco. La unión entre el agente y el primer o segundo dominio de unión es de una afinidad superior a la de la unión entre el primer dominio de unión y el segundo dominio de unión. De esta manera, cuando se presenta el agente preferentemente se une al primer o segundo dominio de unión e inhibe/desorganiza la heterodimerización entre el componente receptor y el componente de señalización. Cuando el antígeno se une al dominio de unión a antígenos del componente receptor en presencia del agente adicional, no hay señalización a través del componente de señalización.

35 Específicamente, en presencia del agente, el componente receptor y componente de señalización se ubican de manera estocásticamente dispersa, y la unión del antígeno por el dominio de unión a antígenos del componente receptor no tiene como resultado la señalización a través del componente de señalización.

40 En el presente documento, la 'colocalización' o 'heterodimerización' de los componentes receptores y de señalización es análoga a la ligación/reclutamiento del componente de señalización al componente receptor mediante la unión del primer dominio de unión del componente receptor y el segundo dominio de unión del componente de señalización.

45 La unión a antígenos por el componente receptor, en presencia del agente, puede denominarse como resultante en señalización 'improductiva' a través del componente de señalización. Esta señalización no tiene como resultado la activación celular, por ejemplo, activación de células T. La unión a antígenos por el componente receptor, en ausencia del agente, puede denominarse como resultante en señalización 'productiva' a través del componente de señalización.

50 Esta señalización tiene como resultado la activación de células T, lo que desencadena, por ejemplo la eliminación de células objetivo y la activación de células T.

La unión a antígenos por el componente receptor, en ausencia del agente, puede tener como resultado la señalización a través del componente de señalización, la cual es 2, 5, 10, 50, 100, 1000 o 10000 veces superior a la señalización que se presenta cuando el antígeno se une por el componente receptor en presencia del agente.

55 La señalización a través del componente de señalización puede determinarse por una diversidad de métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen analizar la transducción de señales, por ejemplo, analizar niveles de proteína tirosina cinasas (PTK) específicas, descomposición de fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂), activación de proteína cinasa C (PKC) y elevación de la concentración intracelular de iones de calcio. Las lecturas funcionales, tales como la expansión clonal de células T, sobreregulación de marcadores de activación en la superficie celular, diferenciación a células efectoras e inducción de citotoxicidad o secreción de citocinas, también pueden utilizarse.

Como ilustración, en los presentes ejemplos los inventores determinaron los niveles de interleucina-2 (IL-2) producidos por células T que expresan un componente receptor y componente de señalización del sistema de CAR, de acuerdo con la presente divulgación, con la unión del antígeno al componente receptor, en presencia de concentraciones variables de un agente.

5 PRIMER DOMINIO DE UNIÓN, SEGUNDO DOMINIO DE UNIÓN Y AGENTE

En el presente sistema de CAR, el primer dominio de unión comprende la Proteína Represora de Tet (TetR) y el segundo dominio de unión comprende el péptido inductor de la Transcripción (TiP), o el primer dominio de unión comprende TiP y el segundo dominio de unión comprende TetR, y el agente es tetraciclina, doxiciclina o minociclina o un análogo de las mismas, posibilitando de esta manera la colocalización y dimerización selectivas del componente receptor y el componente de señalización, en ausencia del agente.

Como tales, el primer dominio de unión y segundo dominio de unión son capaces de unirse específicamente.

El sistema de señalización de la presente divulgación no se limita por la disposición de un sistema de dimerización específico. El componente receptor puede comprender ya sea el primer dominio de unión o el segundo dominio de unión de un sistema de dimerización determinado, siempre y cuando el componente de señalización comprenda el dominio de unión complementario correspondiente, el cual posibilita que el componente receptor y componente de señalización se colocalicen en ausencia del agente.

El agente puede unirse al primer dominio de unión o segundo dominio de unión con una afinidad por lo menos 10, 20, 50, 100, 1000 o 10000 veces mayor a la afinidad entre el primer dominio de unión y el segundo dominio de unión.

20 El agente puede ser tetraciclina, doxiciclina o minociclina o un análogo de las mismas que preferentemente se une al primer dominio de unión o segundo dominio de unión con una afinidad superior a la afinidad entre el primer dominio de unión y el segundo dominio de unión.

El agente es capaz de suministrarse al citoplasma de una célula objetivo y estar disponible para la unión intracelular.

El agente puede ser capaz de cruzar la barrera hematoencefálica.

25 Los sistemas de moléculas pequeñas, para controlar la colocalización de péptidos, se conocen en la materia, por ejemplo, el represor de Tet (TetR), la proteína de interacción con TetR (TiP) y el sistema de tetraciclina (Klotzsche *et al.*; J. Biol. Chem. 280, 24591-24599 (2005); Luckner *et al.*; J. Mol. Biol. 368, 780-790 (2007)).

El sistema represor de Tet (TetR)

30 El operón Tet es un operón biológico reconocido, el cual se ha adaptado para su uso en células de mamífero. El TetR se une a tetraciclina como homodímero y se somete a un cambio de conformación, el cual entonces modula la unión a DNA de las moléculas TetR. Klotzsche *et al.* (mencionado arriba), describió un péptido derivado de expresión en fagos que activa el TetR. Esta proteína (proteína de interacción con TetR/TiP) tiene un sitio de unión en TetR que se superpone, pero no es idéntico, al sitio de unión a tetraciclina (Luckner *et al.*; mencionado arriba). De esta manera, TiP y la tetraciclina compiten por la unión de TetR.

35 En el presente sistema de CAR, el primer dominio de unión del componente receptor es TetR o TiP, con la condición de que el segundo dominio de unión del componente de señalización sea el socio de unión complementario correspondiente. Por ejemplo, si el primer dominio de unión del componente receptor es TetR, el segundo dominio de unión del componente de señalización es TiP. Si el primer dominio de unión del componente receptor es TiP, el segundo dominio de unión del componente de señalización es TetR.

40 Por ejemplo, el primer dominio de unión o segundo dominio de unión puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2:

SEQ ID NO: 1 – TetR

MSRLDKSKVINSALLELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVQPTLYWHVKNKRALLDALAIEMLDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNNAKSF
RCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGH

SEQ ID NO: 2 – TiP

45 MWWTWNAYAFAAPSGGGS

TetR debe homodimerizarse con el fin de funcionar. De esta manera, cuando el primer dominio de unión en el componente receptor es TetR, el componente receptor puede comprender un enlazador entre el dominio transmembranal y el primer dominio de unión (TetR). El enlazador posibilita que TetR se homodimerice con un TetR de un componente receptor vecino y se oriente en dirección correcta.

- 5 El enlazador puede ser la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 3 – endodomino de CD4 modificado

ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRHRQQAERMAQIKRVVSEKKTAQAPHRFQKTCSPI

El enlazador alternativamente puede comprender una secuencia enlazadora alternativa que tiene propiedades espaciadoras de longitud y/o dominio similares a las de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 3.

- 10 El enlazador puede tener por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencias con la SEQ ID NO: 3, siempre y cuando proporcione la función de posibilitar que TetR se homodimerice con un TetR de un componente receptor vecino, y se oriente en dirección correcta.

- 15 Una desventaja potencial del sistema TetR/TiP es que TetR es xenogénico e inmunogénico. La secuencia de TetR, por lo tanto, puede ser una variante que es menos inmunogénica, pero retiene la capacidad para unirse específicamente a TiP.

En casos donde el primer y segundo dominios de unión son TetR o TiP, o una variante de los mismos, el agente es tetraciclina, doxiciclina, minociclina o un análogo de las mismas.

Un análogo se refiere a una variante de tetraciclina, doxiciclina o minociclina que retiene la capacidad para unirse específicamente a TetR.

- 20 Otras combinaciones de dominios de unión y agentes, que pueden utilizarse en el presente sistema de CAR, se conocen en la materia. Por ejemplo, el sistema de CAR puede utilizar un sistema de unión basado en estreptoavidina/biotina.

Epítopo de unión a estreptoavidina (para referencia)

- 25 Se describen en el presente documento uno o más epítopos de unión a estreptoavidina. También se describe en el presente documento un imitador de biotina.

- 30 La estreptoavidina es una proteína de 52,8 kDa de la bacteria *Streptomyces avidinii*. Los homotetrámeros de estreptoavidina tienen una afinidad muy alta por la biotina (vitamina B7 o vitamina H), con una constante de disociación (K_d) $\sim 10^{-15}$ M. El imitador de biotina tiene una afinidad por la estreptoavidina inferior a la de la biotina de tipo silvestre, de modo que la biotina en sí puede utilizarse como agente para desorganizar o impedir la heterodimerización entre el dominio de estreptoavidina y el dominio de imitador de biotina. El imitador de biotina puede unirse a la estreptoavidina, por ejemplo, con una K_d de 1 nM a 100 μ M.

El dominio de 'imitador de biotina', por ejemplo, puede comprender una secuencia peptídica corta (por ejemplo, 6 a 20, 6 a 18, 8 a 18 o 8 a 15 aminoácidos), la cual se une específicamente a la estreptoavidina.

El imitador de biotina puede comprender una secuencia como se muestra en la Tabla 1.

- 35 Tabla 1. Péptidos imitadores de biotina.

nombre	Secuencia	afinidad
Nanotag largo	DVEAWLDERVPLVET (SEQ ID NO: 4)	3,6 nM
Nanotag corto	DVEAWLGAR (SEQ ID NO: 5)	17 nM
Streptag	WRHPQFGG (SEQ ID NO: 6)	
streptagII	WSHPQFEK (SEQ ID NO: 7)	72 μ M
SBP-tag	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP (SEQ ID NO: 8)	2,5 nM
ccstreptag	CHPQGPPC (SEQ ID NO: 9)	230 nM

nombre	Secuencia	afinidad
flankedccstreptag	AECHPQGPPCIEGRK (SEQ ID NO: 10)	

El imitador de biotina puede seleccionarse del siguiente grupo: StreptagII, Flankedccstreptag y ccstreptag.

El dominio de estreptoavidina puede comprender estreptoavidina, que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 11, o un fragmento o variante de la misma, que retiene la capacidad para unirse a biotina.

- 5 La estreptoavidina de longitud completa tiene 159 aminoácidos. Los extremos terminales N y C, de la proteína de longitud completa de 159 residuos, se procesan para proveer una estreptoavidina 'central' más corta, que se compone usualmente de los residuos 13 a 139, y la remoción de los extremos terminales N y C es necesaria para la elevada afinidad de unión a biotina.

La secuencia de la estreptoavidina "central" (residuos 13 a 139) se muestra como SEQ ID No. 11.

- 10 SEQ ID No. 11

EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSgtALGWTVAWKNNYRNAHSA
TTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS

- 15 La estreptoavidina existe en la naturaleza como homotetrámero. La estructura secundaria de un monómero de estreptoavidina se compone de ocho hebras β antiparalelas, que se pliegan para proveer una estructura terciaria de barril beta antiparalelo. Un sitio de unión a biotina se ubica en un extremo de cada barril β . Cuatro monómeros idénticos de estreptoavidina (es decir, cuatro barriles β idénticos) se asocian para proveer la estructura cuaternaria tetramérica de la estreptoavidina. El sitio de unión a biotina en cada barril consiste en los residuos del interior del barril, en conjunto con un Trp120 conservado de la subunidad vecina. En esta forma, cada subunidad contribuye al sitio de unión en la subunidad vecina y, de este modo, el tetrámero también puede considerarse un dímero de los dímeros funcionales.

- 20 El dominio de estreptoavidina descrito en el presente documento puede consistir esencialmente en un monómero, dímero o tetrámero de estreptoavidina.

La secuencia del monómero, dímero o tetrámero de estreptoavidina descrito en el presente documento puede comprender toda o parte de la secuencia mostrada como SEQ ID No. 11, o una variante de la misma, que retiene la capacidad para unirse a biotina.

- 25 Una secuencia de estreptoavidina variante puede tener por lo menos 70, 80, 90, 95 o 99% de identidad con la SEQ ID No. 11, o una porción funcional de la misma. La estreptoavidina variante puede comprender uno o más de los siguientes aminoácidos, los cuales se implican en la unión a biotina: residuos Asn23, Tyr43, Ser27, Ser45, Asn49, Ser88, Thr90 y Asp128. La estreptoavidina variante, por ejemplo, puede comprender la totalidad de los 8 residuos. En casos donde la estreptoavidina variante se presenta en el dominio de unión como dímero o tetrámero, también puede comprender Trp120, el cual se implica en la unión a biotina por la subunidad vecina.

- 30 Agentes de moléculas pequeñas que desorganizan las interacciones proteína-proteína se han desarrollado desde hace tiempo para propósitos farmacéuticos (revisado por Vassilev *et al*; Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions ISBN: 978-3-642-17082-9). Un sistema de CAR, como se describe, puede utilizar esta molécula pequeña. Las proteínas o péptidos cuya interacción se desorganiza (o los fragmentos relevantes de estas proteínas) pueden 35 utilizarse como el primer y/o segundo dominio de unión, y la molécula pequeña puede utilizarse como el agente que inhibe la activación de CAR. Este sistema puede variarse al alterar la molécula pequeña y proteínas, de tal forma que el sistema funcione como se describe, pero la molécula pequeña está desprovista de una actividad farmacológica indeseable (por ejemplo, de manera similar a la descrita por Rivera *et al* (Nature Med; 1996; 2; 1028-1032).

- 40 Una lista de proteínas/péptidos, cuya interacción puede desorganizarse al utilizar un agente tal como una molécula pequeña, se ofrece en la Tabla 2. Información adicional sobre estas PPI se encuentra disponible de White *et al* 2008 (Expert Rev. Mol. Med. 10:e8).

Tabla 2

Proteína de interacción 1	Proteína de interacción 2	Inhibidor de PPI
p53	MDM2	Nutlinna
Miembro antiapoptótico de Bcl2	Miembro apoptótico de Bcl2	GX015 y ABT-737
Caspasa 3, 7 o 9	Inhibidor de proteína de apoptosis	DIABLO y miméticos de DIABLO

Proteína de interacción 1	Proteína de interacción 2	Inhibidor de PPI
	asociado al cromosoma X (XIAP)	
RAS	RAF	Derivado de furano-indeno
FR2-7	Dominio PD2 de DVL	FJ9
Factor de células T (TCF)	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CBP)	ICG-001

Los segundos dominios de unión, que se unen competitivamente al mismo primer dominio de unión como los agentes arriba descritos y, de esta manera, pueden utilizarse para colocarizar el componente receptor y componente de señalización descritos en el presente documento en ausencia del agente, pueden identificarse al utilizar técnicas y métodos que son ampliamente conocidos en la materia. Por ejemplo, estos segundos dominios de unión pueden identificarse por la expresión de una biblioteca de VHH de un solo dominio.

El primer dominio de unión y/o segundo dominio de unión del presente sistema de señalización puede comprender una o más variantes, con la capacidad para unirse específicamente al dominio de unión recíproco y, de esta manera, facilitar la colocarización del componente receptor y componente de señalización.

- 10 Las secuencias variantes pueden tener por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencias con la secuencia de tipo silvestre, siempre y cuando las secuencias proporcionen un sistema de dimerización efectivo. Es decir, siempre y cuando las secuencias faciliten una colocarización suficiente del receptor y componentes de señalización, en ausencia del agente, para que ocurra una señalización productiva con la unión del dominio de unión a antígenos al antígeno.
- 15 Se describe en el presente documento un método para inhibir el sistema de CAR del primer aspecto de la divulgación, y el método comprende la etapa de administrar el agente. Como se describe arriba, la administración del agente tiene como resultado una desorganización de la colocarización entre el componente receptor y el componente de señalización, de tal forma que la señalización a través del componente de señalización se inhibía incluso con la unión del antígeno al dominio de unión a antígenos.
- 20 El primer y segundo dominios de unión pueden facilitar la señalización a través del sistema de CAR, lo cual es proporcional a la concentración del agente que se presenta. De esta manera, mientras que el agente se une al primer dominio de unión o el segundo dominio de unión con una afinidad superior a la afinidad de unión entre el primer y segundo dominios de unión, la colocarización del receptor y componentes de señalización no puede eliminarse completamente en presencia de bajas concentraciones del agente. Por ejemplo, las bajas concentraciones del agente pueden disminuir el nivel total de señalización en respuesta al antígeno sin inhibirlo completamente. Las concentraciones específicas del agente diferirán dependiendo del nivel de señalización requerida y de los dominios de unión y agente específicos. Los niveles de señalización, y la correlación con la concentración del agente, pueden determinarse al utilizar métodos conocidos en la materia, como se describe arriba.
- 25

COMPONENTE RECEPTOR

- 30 Se describe en el presente documento un componente receptor que comprende un dominio de unión a antígenos, un dominio espaciador opcional, un dominio transmembranal y un primer dominio de unión. Cuando se expresa en una célula, el componente receptor se localiza en la membrana celular. Aquí, el dominio de unión a antígenos de la molécula se orienta en el lado extracelular de la membrana, y el primer dominio de unión se localiza en el lado intracelular de la membrana.
- 35 El componente receptor, por lo tanto, proporciona la función de unión a antígenos del sistema de CAR de la presente divulgación.

DOMINIO DE UNIÓN A ANTÍGENOS

El dominio de unión a antígenos es la porción de un CAR clásico que reconoce al antígeno. En el sistema de señalización de la presente divulgación, la unión a antígenos se ubica dentro del componente receptor.

- 40 Numerosos dominios de unión a antígenos se conocen en la técnica, incluyendo aquellos basados en el sitio de unión a antígenos de un anticuerpo, miméticos de anticuerpos y receptores de células T. Por ejemplo, el dominio de unión a antígenos puede comprender: un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal, un ligando natural del antígeno objetivo, un péptido con suficiente afinidad por el objetivo, una porción de unión de un solo dominio tal como de un camélido, una porción de unión simple artificial tal como una Darpin, o una cadena sencilla derivada de un receptor de células T.
- 45

Se conocen diversos antígenos asociados a tumores (TAA), como se muestra en la siguiente Tabla 1. El dominio de

unión a antígenos, utilizado en la presente divulgación, puede ser un dominio que es capaz de unirse a un TAA, como se indica en la misma.

Tabla 1

Tipo de cáncer	TAA
Linfoma difuso de células B grandes	CD19, CD20
Cáncer de mama	ErbB2, MUC1
AML	CD13, CD33
Neuroblastoma	GD2, NCAM, ALK, GD2
B-CLL	CD19, CD52, CD160
Cáncer colorrectal	Proteína de unión a folato, CA-125
Leucemia linfocítica crónica	CD5, CD19
Glioma	EGFR, Vimentina
Mieloma múltiple	BCMA, CD138
Carcinoma de células renales	Anhidrasa carbónica IX, G250
Cáncer de próstata	PSMA
Cáncer intestinal	A33

5 DOMINIO TRANSMEMBRANAL

El dominio transmembranal es la secuencia de un CAR clásico que abarca la membrana. En el sistema de señalización de la presente divulgación, el dominio transmembranal se ubica en el componente receptor. El mismo puede comprender una hélice alfa hidrofóbica. El dominio transmembranal puede derivarse de CD28, lo que ofrece una buena estabilidad del receptor.

10 PÉPTIDO DE SEÑAL

El componente receptor del sistema de CAR de la presente divulgación puede comprender un péptido de señal a fin de que, cuando el componente receptor se exprese en una célula, tal como una célula T, la proteína naciente se dirija al retículo endoplásmico y, subsecuentemente, a la superficie celular donde se expresa.

15 El núcleo del péptido de señal puede contener un tramo largo de aminoácidos hidrofóbicos que tiene tendencia a formar una sola hélice alfa. El péptido de señal puede comenzar con un tramo corto de aminoácidos cargados positivamente, lo cual ayuda a forzar la topología apropiada del polipéptido durante la traslocación. Al final del péptido de señal típicamente hay un tramo de aminoácidos que se reconoce y escinde por la peptidasa de señal. La peptidasa de señal puede escindir, durante o después de la terminación de la traslocación, para generar un péptido de señal libre y una proteína madura. Los péptidos de señal libres entonces se digieren por proteasas específicas.

20 El péptido de señal puede estar en el extremo amino terminal de la molécula.

El péptido de señal puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 12, 13 o 14, o una variante de la misma que tiene 5, 4, 3, 2 o 1 mutación de aminoácidos (inserciones, sustituciones o adiciones) siempre y cuando el péptido de señal aún funcione para dar lugar a la expresión en superficie celular del CAR.

SEQ ID NO: 12: MGTSLLCWMALCLLGADHADG

25 El péptido de señal de la SEQ ID NO: 12 es compacto y altamente eficiente. Se prevé que ofrece aproximadamente 95% de escisión después de la glicina terminal, lo que da una eficiente remoción por la peptidasa de señal.

SEQ ID NO: 13: MSLPVTLALLPLALLLHAARP

El péptido de señal de la SEQ ID NO: 13 se deriva de IgG1.

SEQ ID NO: 14: MAVPTQVLGLLLLWLTDARC

30 El péptido de señal de la SEQ ID No. 14 se deriva de CD8.

DOMINIO ESPACIADOR

El sistema de CAR, descrito en el presente documento, puede comprender una secuencia espaciadora para conectar

el dominio de unión a antígenos con el dominio transmembranal en el componente receptor. Un espaciador flexible permite que el dominio de unión a antígenos se oriente en diferentes direcciones para facilitar la unión.

La secuencia espaciadora, por ejemplo, puede comprender una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8 humano o el tallo de CD8 de ratón. El espaciador alternativamente puede comprender una secuencia enlazadora alternativa que tiene propiedades espaciadoras de longitud y/o dominio similares a las de una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8. Un espaciador de IgG1 humana puede alterarse para remover los motivos de unión de Fc.

Ejemplos de secuencias de aminoácidos para estos espaciadores se proveen a continuación:

SEQ ID NO: 15 (bisagra-CH2CH3 de IgG1 humana)

10 AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KKD

SEQ ID NO: 16 (tallo de CD8 humano):

15 TTPAPRPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDI

SEQ ID NO: 17 (bisagra de IgG1 humana):

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

SEQ ID NO: 18 (ectodomino de CD2)

20 KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDKKIAQFRKEKETFKEKDTYKLFKNGLTLKIKHLKTDDQDI
YKVIYDTKGKVNLEKIFDLKIQERVSXPKISWTCINTTLCEVMNGTDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKF
KCTAGNKVSKESSVEPVSCPEKGLD

SEQ ID NO: 19 (ectodomino de CD34)

25 SLDNNNGTATPELPTQGTFNSVNSTNVSYQETTPSTLGSTSLLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSITSVYGNNTNSSV
QSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSLATSPTPYTSPILDIAEIKCGIREVKLTQGICLE
QNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQADADAGAQVCSLLAQSEVRPQCLLVLANRTEISSKQLQMLKKHQSDLKK
LGILDFTEQDVASHQSYSQKT

COMPONENTE RECEPTOR QUE COMPRENDE UNA PLURALIDAD DE PRIMEROS DOMINIOS DE UNIÓN

El componente receptor puede comprender una pluralidad de primeros dominios de unión y, de esta manera, ser capaz de reclutar más de un componente de señalización.

30 La pluralidad de primeros dominios de unión puede presentarse en un solo dominio intracelular del componente receptor.

El componente receptor puede comprender un número apropiado de dominios transmembranales de tal forma que cada primer dominio de unión se oriente en el lado intracelular de la membrana celular. Por ejemplo, el componente receptor puede comprender 3, 5, 7, 9, 11 o más dominios transmembranales. En esta forma, un solo componente receptor puede reclutar múltiples componentes de señalización que amplifican la señalización en respuesta al antígeno.

Los primeros dominios de unión pueden ser, cada uno, variantes que tienen una afinidad diferente por el segundo dominio de unión del componente de señalización.

COMPONENTES RECEPTORES MÚLTIPLES

40 En otra modalidad de la divulgación, el sistema de CAR puede comprender dos o más componentes receptores, y cada uno reconoce diferentes antígenos pero se comprende del mismo primer dominio de unión intracelular. Este sistema de CAR podría ser capaz de reconocer múltiples antígenos (Figura 11). Este sería útil, por ejemplo, en evitar el escape tumoral. En un aspecto adicional relacionado de la divulgación, los primeros dominios de unión de los componentes receptores difieren en los residuos que dictan su afinidad por el segundo dominio de unión del componente de señalización. En esta forma, un sistema de CAR puede afinarse de tal forma que la señalización, en respuesta a un antígeno, sea superior o inferior a la de la respuesta a otro (Figura 11). Esto podría ser útil, por ejemplo, cuando se orienta a dos antígenos tumorales simultáneamente, pero uno se expresa a una densidad superior a la del otro. La respuesta a este antígeno puede atenuarse para evitar la toxicidad ocasionada por la sobreestimulación.

Los métodos adecuados para alterar los residuos de aminoácidos del primer o segundo dominio de unión, de tal forma que la afinidad de unión entre los dos dominios se altere, se conocen en la materia e incluyen la sustitución, adición y remoción de aminoácidos al utilizar tanto mutagénesis dirigida como aleatoria. Los métodos para determinar la afinidad de unión entre un primer dominio de unión y un segundo dominio de unión también son ampliamente conocidos en la materia, e incluyen la predicción por bioinformática de interacciones proteína-proteína, electroforesis de afinidad, resonancia de plasma de superficie, interferometría de biocapa, interferometría de polarización dual, dispersión de luz estática y dispersión de luz dinámica.

COMPONENTE DE SEÑALIZACIÓN

5 Se describe en el presente documento un componente de señalización que comprende un dominio de señalización y un segundo dominio de unión. El componente de señalización es una molécula soluble y, de esta manera, se localiza en el citoplasma cuando se expresa en una célula, por ejemplo, una célula T.

10 No se presenta señalización a través del dominio de señalización del componente de señalización a menos que se colocalice con el componente receptor descrito en el presente documento. Esta colocalización se presenta sólo en ausencia del agente, como se describe arriba.

15 DOMINIO DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

20 El dominio de señalización intracelular es la porción de transmisión de señales de un CAR clásico. En el sistema de señalización de la presente divulgación, el dominio de señalización intracelular (dominio de señalización) se ubica en el componente de señalización. En ausencia del agente, el componente receptor asociado a membrana y el componente de señalización intracelular se acercan. Después del reconocimiento de antígenos, los receptores se agrupan, el CD45 y CD148 nativos se excluyen de la sinapsis, y una señal se transmite a la célula.

Como tal, el dominio de señalización del componente de señalización es análogo al endodomino de una molécula de CAR clásico.

25 El componente de dominio de señalización más comúnmente utilizado es el del endodomino de CD3-zeta, el cual contiene 3 ITAM. Este transmite una señal de activación a la célula T después de que se une el antígeno. CD3-zeta no puede proporcionar una señal de activación completamente competente y puede necesitarse una señalización coestimuladora adicional. Por ejemplo, el CD28 y OX40 químéricos pueden utilizarse con CD3-zeta para transmitir una señal proliferativa/de supervivencia, o los tres pueden utilizarse en conjunto (ilustrado en la Figura 1B).

30 El componente de señalización, descrito en el presente documento, comprende un dominio de señalización, y puede comprender el endodomino de CD3-zeta solo, el endodomino de CD3-zeta con el de CD28 o OX40, o el endodomino de CD28 y el endodomino de OX40 y de CD3-zeta (Figura 3A).

El componente de señalización de un sistema de CAR, de acuerdo con la presente divulgación, puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 20, 21 o 22, o una variante de la misma que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencias.

SEQ ID NO: 20 - endodomino de CD3 Z

35 RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 21 - endodomios de CD28 y CD3 zeta

40 SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

SEQ ID NO: 22 - endodomios de CD28, OX40 y CD3 zeta

SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHLSTLAKI
RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

45 Una secuencia variante puede tener por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencias con la SEQ ID NO: 20, 21 o 22, siempre y cuando la secuencia proporcione un dominio de señalización intracelular efectivo.

COMPONENTES DE SEÑALIZACIÓN MÚLTIPLES

El sistema de señalización, de acuerdo con la divulgación, puede comprender una pluralidad de componentes de señalización, y cada uno comprende un dominio de señalización y un segundo dominio de unión, en donde cada segundo dominio de unión se une por el mismo primer dominio de unión del componente receptor, pero los dominios de señalización comprenden diferentes endodominiios (Figura 9). En esta forma, múltiples endodominiios diferentes pueden activarse simultáneamente. Esto es favorable sobre un dominio de señalización compuesto dado que cada dominio de señalización permanece libre de restricciones de otros dominios de señalización.

Si cada componente de señalización comprende un segundo dominio de unión que difiere en los residuos que alteran su afinidad por el primer dominio de unión del componente receptor, los componentes de señalización que comprenden diferentes dominios de señalización se ligan al primer dominio de unión con cinética diferente (Figura 10). Esto permite un mayor control sobre la señalización en respuesta a la unión a antígenos por el componente receptor, dado que se reclutan diferentes componentes de señalización al componente receptor en una cinética/dinámica variable. Esto es favorable dado que, en vez de una relación proporcional igual fija de la señal transmitida por un endodominiio compuesto, una señal de activación de células T óptima puede requerir diferentes proporciones de diferentes señales inmunológicas.

ÁCIDO NUCLEICO

Se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica el componente receptor y un ácido nucleico que codifica un componente de señalización.

Como se utilizan en el presente documento, los términos “polinucleótido”, “nucleótido” y “ácido nucleico” tienen la finalidad de ser sinónimos entre sí.

Se entenderá por un experto que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido, como resultado de la degeneración del código genético. Además, se entenderá que los expertos, al utilizar técnicas de rutina, pueden hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos aquí descritos, para reflejar el uso de codones de cualquier organismo hospedador particular en el cual se expresarán los polipéptidos.

Los ácidos nucleicos, de acuerdo con la divulgación, pueden comprender DNA o RNA. Estos pueden ser de hebra sencilla o de doble hebra. También pueden ser polinucleótidos que se incluyen dentro de los nucleótidos sintéticos o modificados. Una serie de diferentes tipos de modificaciones para oligonucleótidos se conoce en la materia. Estas incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato, y adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para propósitos del uso que se describe en la presente, se entenderá que los polinucleótidos pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Estas modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de potenciar la actividad o vida útil *in vivo* de los polinucleótidos de interés.

Los términos “variante”, “homólogo” o “derivado”, con relación a una secuencia de nucleótidos, incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, eliminación o adición de un ácido nucleico (o más) de o a la secuencia.

El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico que codifica tanto el componente receptor como el componente de señalización.

El ácido nucleico puede producir un polipéptido que comprende el componente receptor y el componente de señalización unidos por un sitio de escisión. El sitio de escisión puede ser de autoescisión de tal modo que, cuando el polipéptido se produzca, se escinda inmediatamente en el componente receptor y el componente de señalización, sin necesidad de alguna actividad de escisión externa.

Se conocen diversos sitios de autoescisión, incluyendo el péptido de autoescisión 2a del virus de la fiebre aftosa (FMDV), que tiene la secuencia mostrada:

SEQ ID NO: 23
RAEGRGSLLTCGDVEENPGP.

45 o

SEQ ID NO: 24
QCTNYALLKLAGDVESNPGP

El ácido nucleico puede producir un polipéptido que comprende la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 25

MWTWNAYAFAAPSGGSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSLLTCGDVEENPGMAVPTQVLGLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGTQYTLTSSLQPEDFATYYCQHYKNYPL

5 TFGQGTKLEIKRSGGGGGGGGGGGGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSI
SLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGTLTVSSMDPAEPKSPDKTHTCPP
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSSLPGKKDPM.....SGGGGMSRLDKSKVINSALLELNEVGIEGLTTR
10 KLAQKLGVEQPTLYWHVKKNKRALLDALAIEMLDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLE
NQIAFLCQQQFSLENALYALSAVGHTIGCVLEDQEHQVAKEERETPTTDSMPPLLQAIELFDHQGAEP AFLFGLELIICGLEKQ
LKCESGS

En donde indica la posición donde puede incluirse una secuencia de dominio de unión a antígenos. Cualquier dominio de unión a antígenos puede incluirse, por ejemplo, un scFV, como se describe en el presente documento.

15 La secuencia de coexpresión puede ser una secuencia interna de entrada a ribosomas (IRES). La secuencia de coexpresión puede ser un promotor interno.

Se describe en el presente documento un equipo que comprende un ácido nucleico que codifica el componente receptor y/o un ácido nucleico que codifica un componente de señalización.

VECTOR

20 Se describe en el presente documento un vector o equipo de vectores que comprenden una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican un componente receptor y/o componente de señalización. Este vector puede utilizarse para introducir la o las secuencias de ácidos nucleicos en una célula hospedadora, a fin de que exprese el componente receptor y componente de señalización del sistema de CAR de acuerdo con la divulgación.

25 El vector, por ejemplo, puede ser un plásmido o un vector viral, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral, o un vector basado en transposones o mRNA sintético.

El vector puede ser capaz de transfectar o transducir una célula T o una célula NK.

CÉLULA INMUNE CITOLÍTICA

La presente divulgación también se relaciona con una célula T o una célula NK que comprende el sistema de CAR, de acuerdo con la divulgación.

30 La célula inmune citolítica puede comprender un ácido nucleico o un vector de la presente divulgación.

La célula inmune citolítica puede comprender un componente receptor y un componente de señalización descritos en el presente documento.

35 La célula inmune citolítica puede comprender por lo menos un componente de señalización descrito en el presente documento. Por ejemplo, la célula inmune citolítica puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o hasta una pluralidad de componentes de señalización descritos en el presente documento.

La célula inmune citolítica puede comprender por lo menos un componente receptor descritos en el presente documento. Por ejemplo, la célula inmune citolítica puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o hasta una pluralidad de componentes receptores descritos en el presente documento.

40 Las células inmunes citolíticas pueden ser células T o linfocitos T, los cuales son un tipo de linfocito que tiene una función central en la inmunidad mediada por células. Estos pueden distinguirse de otros linfocitos, tales como células B y células asesinas naturales (células NK), por la presencia de un receptor de células T (TCR) en la superficie celular. Existen diversos tipos de células T, como se resume a continuación.

45 Las células T cooperadoras (células Th) ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos inmunológicos, incluyendo maduración de células B a células plasmáticas y células B de memoria, y activación de células T citotóxicas y macrófagos. Las células Th expresan CD4 en su superficie. Las células Th se activan cuando se presentan con antígenos peptídicos por moléculas del MHC clase II en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Estas células pueden diferenciarse a uno de varios subtipos, incluyendo TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 o TFH, que secretan diferentes citocinas para facilitar diferentes tipos de respuestas inmunes.

Las células T citolíticas (células TC, o CTL) destruyen células infectadas por virus y células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Las CTL expresan el CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con el MHC clase I, el cual se presenta en la superficie de todas las células con núcleo. A través de IL-10, adenosina y otras moléculas secretadas por las células T reguladoras, las células CD8+ pueden inactivarse a un estado anérgico, lo cual previene enfermedades autoinmunes tales como la encefalomielitis autoinmune experimental.

5 Las células T de memoria son un subconjunto de células T específicas de antígenos que persisten a largo plazo después de que una infección se ha resuelto. Se expanden rápidamente a grandes cantidades de células T efectoras con la reexposición a su antígeno afín, lo que de esta manera dota al sistema inmune de "memoria" contra infecciones 10 anteriores. Las células T de memoria comprenden tres subtipos: células T de memoria centrales (células TCM) y dos tipos de células T de memoria efectoras (células TEM y células TEMRA). Las células de memoria pueden ser CD4+ o CD8+. Las células T de memoria típicamente expresan la proteína de superficie celular CD45RO.

15 Las células T reguladoras (células Treg), anteriormente conocidas como células T supresoras, son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Su función principal es apagar la inmunidad mediada por células T hacia el final de una reacción inmune y suprimir las células T autorreactivas que escaparon al proceso de selección negativa en el timo.

Se han descrito dos clases principales de células Treg CD4+: células Treg de origen natural y células Treg adaptadas.

20 Las células Treg de origen natural (también conocidas como células Treg CD4+CD25+FoxP3+) surgen en el timo y se han asociado a interacciones entre células T en desarrollo con células dendríticas mieloides (CD11c+) y plasmocitoídes (CD123+) que se han activado con TSLP. Las células Treg de origen natural pueden distinguirse de otras células T por la presencia de una molécula intracelular denominada FoxP3. Las mutaciones del gen FOXP3 pueden impedir el desarrollo de células T reguladoras, lo que da lugar a la enfermedad autoinmune fatal IPEX.

Las células Treg adaptadas (también conocidas como células Tr1 o células Th3) pueden originarse durante una respuesta inmune normal.

25 Las Células Asesinas Naturales (o células NK) son un tipo de célula citolítica que forma parte del sistema inmune innato. Las células NK proporcionan respuestas rápidas a las señales innatas de células infectadas con virus en una forma independiente del MHC.

30 Las células NK (que pertenecen al grupo de células linfoides innatas) se definen como linfocitos granulares grandes (LGL) y constituyen la tercera clase de células diferenciadas a partir del progenitor linfoides común que genera linfocitos B y T. Se sabe que las células NK se diferencian y maduran en la médula ósea, nódulos linfáticos, bazo, tonsillas y timo, donde luego entran en la circulación.

Las células con CAR de la divulgación pueden ser cualquiera de los tipos celulares mencionados anteriormente.

35 Las células T o NK que expresan las moléculas del sistema de CAR, de acuerdo con la divulgación, pueden crearse *ex vivo*, ya sea a partir de la sangre periférica propia de un paciente (1^a parte) o en el entorno de un trasplante de células troncales hematopoyéticas de sangre periférica de donante (2^a parte) o sangre periférica de un donante sin relación (3^a parte).

40 Alternativamente, las células T o NK que expresan las moléculas del sistema de CAR, de acuerdo con la divulgación, pueden derivarse de la diferenciación *ex vivo* de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias a células T. Alternativamente, puede utilizarse una línea de células T inmortalizadas, que retienen su función lítica y pueden actuar como agente terapéutico.

En todas estas modalidades, las células con CAR se generan al introducir DNA o RNA que codifica el componente receptor y componente de señalización por uno de muchos medios, incluyendo la transducción con un vector viral, o transfección con DNA o RNA.

45 La célula con CAR de la divulgación puede ser una célula T o NK *ex vivo* de un sujeto. La célula T o NK puede ser de una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células T o NK pueden activarse y/o expandirse antes de transducirse con ácido nucleico que codifica las moléculas que proporcionan el sistema de CAR de acuerdo con la divulgación, por ejemplo, por el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD3.

La célula T o NK de la divulgación puede producirse por:

50 (i) aislamiento de una muestra que contiene células T o NK de un sujeto u otras fuentes listadas anteriormente; y

(ii) transducción o transfección de las células T o NK con una o más de una secuencia de ácido nucleico que codifica el componente receptor y/o componente de señalización del sistema de CAR, de acuerdo con el segundo y tercer aspectos de la invención.

5 Las células T o NK entonces pueden purificarse, por ejemplo, seleccionarse con base en la expresión del dominio de unión a antígenos del polipéptido de unión a antígenos.

Se describe en el presente documento un equipo que comprende una célula T o NK, que comprende el sistema de CAR de acuerdo con la divulgación.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

10 La presente divulgación también se relaciona con una composición farmacéutica que contiene una pluralidad de células que expresan los componentes del sistema de CAR de la divulgación. La composición farmacéutica adicionalmente puede comprender un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica opcionalmente puede comprender uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Tal formulación, por ejemplo, puede estar en forma adecuada para infusión intravenosa.

MÉTODO DE TRATAMIENTO

15 Se describe en el presente documento un método para tratar y/o prevenir una enfermedad, el cual comprende la etapa de administrar las células de la presente divulgación (por ejemplo, en una composición farmacéutica como se describe arriba) a un sujeto.

20 Un método para tratar una enfermedad se relaciona con el uso terapéutico de las células de la presente divulgación. En el presente documento, las células pueden administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o padecimiento existente con el fin de aminorar, reducir o mejorar por lo menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o para desacelerar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.

25 El método para prevenir una enfermedad se relaciona con el uso profiláctico de las células de la presente divulgación. En el presente documento, estas células pueden administrarse a un sujeto que no ha contraído la enfermedad, y/o que no muestra síntoma alguno de la enfermedad, para impedir o afectar la causa de la enfermedad, o para reducir o impedir el desarrollo de por lo menos un síntoma asociado con la enfermedad. El sujeto puede tener predisposición o puede considerarse en riesgo de desarrollar la enfermedad.

El método puede implicar las etapas de:

30 (i) aislar una muestra que contiene células T o NK;
 (ii) transducir o transfectar estas células con una secuencia de ácido nucleico o vector proporcionado por la presente divulgación;
 (iii) administrar las células de (ii) a un sujeto.

35 La muestra que contiene células T o NK puede aislarse a partir de un sujeto o a partir de otras fuentes, por ejemplo, como se describe arriba. Las células T o NK pueden aislarse a partir de la sangre periférica propia de un sujeto (1^a parte), o en el entorno de un trasplante de células troncales hematopoyéticas de sangre periférica de donante (2^a parte), o sangre periférica de un donante sin relación (3^a parte).

40 Los métodos descritos en el presente documento, para tratar una enfermedad, pueden implicar el monitoreo de la progresión de la enfermedad y cualquier actividad tóxica, y la administración de un agente adecuado para su uso en el sistema de CAR, de acuerdo con la divulgación, para inhibir la señalización por CAR y, en consecuencia, reducir o aminorar cualquier efecto tóxico adverso.

45 Los métodos descritos en el presente documento, para tratar una enfermedad, pueden implicar el monitoreo de la progresión de la enfermedad y el monitoreo de cualquier actividad tóxica, y el ajuste de la dosis del agente administrado al sujeto, para proporcionar niveles aceptables de la progresión de enfermedad y actividad tóxica.

Monitorear la progresión de la enfermedad significa valorar los síntomas asociados con la enfermedad con el paso del tiempo para determinar si se reducen/mejoran o se incrementan/empeoran.

45 Las actividades tóxicas se relacionan con los efectos adversos ocasionados por las células con CAR de la divulgación, después de su administración a un sujeto. Las actividades tóxicas pueden incluir, por ejemplo, toxicidad inmunológica, toxicidad biliar y síndrome de dificultad respiratoria.

- 5 El nivel de señalización a través del sistema de señalización de la divulgación y, por lo tanto, el nivel de activación de las células con CAR que expresan el sistema de señalización, puede ajustarse al alterar la cantidad de agente presente, o la cantidad de tiempo en que el agente se presenta. En el método presente, el nivel de activación de células con CAR puede aumentarse al disminuir la dosis del agente administrado al sujeto, o disminuir la frecuencia de su administración. Por el contrario, el nivel de activación de células con CAR puede reducirse al incrementar la dosis del agente, o la frecuencia de la administración al sujeto.
- 10 Los niveles más altos de la activación de células con CAR probablemente se asocian con una progresión de enfermedad reducida pero actividades tóxicas incrementadas, mientras que los niveles inferiores de la activación de células con CAR probablemente se asocian con una progresión de enfermedad incrementada pero actividades tóxicas reducidas.
- 15 Se describe en el presente documento un método para tratar y/o prevenir una enfermedad en un sujeto, sujeto que comprende células de la divulgación, y el método comprende la etapa de administrar un agente adecuado para su uso en el sistema de CAR, de acuerdo con la divulgación, al sujeto. Como tal, este método implica la administración de un agente adecuado a un sujeto que ya comprende células con CAR de la presente divulgación.
- 20 25 Como tal, la dosis del agente administrado a un sujeto, o la frecuencia de administración, pueden alterarse con el fin de proporcionar un nivel aceptable tanto de la progresión de enfermedad como de la actividad tóxica. El nivel específico de la progresión de enfermedad y actividades tóxicas, determinado como 'aceptable', variará de acuerdo con las circunstancias específicas y debe valorarse sobre esta base. Se describe en el presente documento un método para alterar el nivel de activación de las células con CAR, con el fin de lograr este nivel apropiado.
- 25 Se describe en el presente documento una célula con CAR de la presente divulgación, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.
- 30 Se describe en el presente documento el uso de una célula con CAR de la presente divulgación, en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.
- 35 Se describe en el presente documento un agente adecuado para inhibir un sistema de CAR de acuerdo con la divulgación, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.
- 40 45 Se describe en el presente documento un agente para su uso en la inhibición de un sistema de CAR, de acuerdo con la divulgación, en una célula con CAR.
- 45 Se describe en el presente documento el uso de un agente adecuado para inhibir un sistema de CAR, de acuerdo con la divulgación, en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.
- 50 La enfermedad a tratarse y/o prevenirse por los métodos descritos en el presente documento puede ser una infección, tal como una infección viral.
- 55 Los métodos descritos en el presente documento también pueden ser para el control de respuestas inmunes patógenas, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes, alergias y rechazo injerto versus huésped.
- 60 Los métodos de la divulgación son para el tratamiento de una enfermedad cancerosa, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer endometrial, cáncer de riñón (células renales), leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.
- 65 Las células con CAR de la presente divulgación pueden ser capaces de eliminar células objetivo, tales como células cancerosas. La célula objetivo puede ser reconocible por la expresión de un TAA, por ejemplo, la expresión de un TAA proporcionado arriba en la Tabla 1.
- 70 75 Las células con CAR y las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser para su uso en el tratamiento y/o prevención de las enfermedades arriba descritas.
- 80 Las células con CAR y las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser para su uso en cualquiera de los métodos arriba descritos.

La invención se describirá ahora además por medio de Ejemplos, los cuales pretenden servir para ayudar a un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no se destinan en forma alguna a limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Funcionalidad del sistema de señalización de TetCAR

5 Una construcción bicistrónica se expresó como un solo transcrito que se autoescinde en el sitio 2A para proveer TiP fusionado a eGFP y un CAR con TetR como su endodomnio (Figura 5a).

La microscopía fluorescente de células SupT1, que expresaban esta construcción en ausencia de tetraciclina, demostró que la fluorescencia de eGFP puede observarse claramente en la membrana celular (Figura 5b) mientras que, en presencia de tetraciclina, la eGFP fue citoplásica (Figura 5c). Estos datos demuestran que la tetraciclina ha desplazado a TiP del CAR con TetR.

Ejemplo 2 – Señalización a través del sistema de TetCAR

10 Una construcción bicistrónica se expresó en células T BW5 como un solo transcrito, el cual se autoescinde en el sitio 2A para proveer un componente de señalización que comprende TiP fusionado mediante un enlazador flexible al endodomnio de CD3-zeta, y un componente receptor que comprende un CD33 que reconoce a scFv, un espaciador derivado del dominio Fc de IgG1, un dominio transmembranal e intracelular derivado de CD4, y TetR (Figura 6a). También se expresó un control que era idéntico, excepto que TiP estaba ausente del componente de señalización (Figura 6b).

15 Las células T BW5 se desafiaron con células SupT1 de tipo silvestre o células SupT1 diseñadas para expresar CD33 en ausencia de tetraciclina o en presencia de concentraciones crecientes de tetraciclina. Las células T desafiadadas con células SupT1 de tipo silvestre no se activaron en presencia o ausencia de tetraciclina, y las células T desafiadadas con células SupT1 que expresaban CD33 se activaron en ausencia de tetraciclina, pero la activación se inhibió rápidamente en presencia de tetraciclina con la activación inhibida por completo en presencia de tetraciclina 100 nM (Figura 7a).

20 25 Un TetCAR de control, que carecía del dominio TiP, también se transdujo en BW5. Una vez más, estas células T se desafiaron con células SupT1 de tipo silvestre o células SupT1 diseñadas para expresar CD33 en ausencia o en presencia de una concentración creciente de tetraciclina. La falta del elemento TiP en el componente de señalización tuvo como resultado la falta de señalización en cualquier condición (Figura 7b).

Ejemplo 3 – Señalización del sistema de TetCAR en células T primarias

30 Células SupT1 (los cuales son negativas a CD19) se diseñaron para que fueran positivas a CD19, ofreciendo líneas celulares negativas y positivas al objetivo, las cuales eran similares en la medida de lo posible. Células T primarias humanas de 3 donadores se transdujeron con tres construcciones de CAR: (i) CAR anti-CD19 de 1^a generación “clásico”, (ii) tetCAR anti-CD19 de 1^a generación, (iii) tetCAR anti-CD19 de control donde TiP está ausente del endodomnio. Células T sin transducir y células T transducidas con las diferentes construcciones de CAR se desafiaron 1:1 con células SupT1 o células SupT1.CD19, en presencia de diferentes concentraciones de tetraciclina. El sobrenadante se muestreó 48 horas después del desafío. El sobrenadante del fondo (células T solas) y el máximo (células T estimuladas con PMA/Ionomicina) también se muestrearon. El interferón gamma se midió en los sobrenadantes por ELISA (Figura 13). Las células T con CAR “clásico” se activaron por SupT1.CD19, independientemente de la tetraciclina. Las células T con TetCAR se activaron por células SupT1.CD19, pero la activación se inhibió por la tetraciclina. Las células T con TetCAR de control y NT no respondieron a las células SupT1.CD19.

Ejemplo 4 – Eliminación de células objetivo

40 45 Al continuar a partir del estudio de liberación de interferón gamma descrito en el Ejemplo 3, la eliminación de células objetivo se demostró al utilizar un ensayo de liberación de cromo. Células SupT1 y SupT1.CD19 se cargaron con ⁵¹Cr y se incubaron con células T de control y células con Tet-CAR por 4 horas en presencia o ausencia de tetraciclina. La lisis de células objetivo se determinó por el conteo de ⁵¹Cr en el sobrenadante. Los resultados se muestran en la Figura 14. Se demostró que las células T con Tet-CAR lisaron las células SupT1.CD19 objetivo sólo en ausencia de tetraciclina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCL Business PLC
 5 <120> Sistema de señalización
 <130> P105610PCT
 10 <150> GB1415347.2
 <151> 29-08-2014
 <160> 29
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 15 <210> 1
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Dominio de unión a TetR
 <400> 1
 25

Met	Ser	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Lys	Val	Ile	Asn	Ser	Ala	Leu	Glu	Leu
1															15

Leu	Asn	Glu	Val	Gly	Ile	Glu	Gly	Leu	Thr	Thr	Arg	Lys	Leu	Ala	Gln
								20	25						30

Lys	Leu	Gly	Val	Glu	Gln	Pro	Thr	Leu	Tyr	Trp	His	Val	Lys	Asn	Lys
							35	40							45

Arg	Ala	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Ala	Ile	Glu	Met	Leu	Asp	Arg	His	His
		50				55				60					

Thr	His	Phe	Cys	Pro	Leu	Glu	Gly	Glu	Ser	Trp	Gln	Asp	Phe	Leu	Arg
					65		70			75					80

Asn	Asn	Ala	Lys	Ser	Phe	Arg	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser	His	Arg	Asp	Gly
								85		90					95

Ala	Lys	Val	His	Leu	Gly	Thr	Arg	Pro	Thr	Glu	Lys	Gln	Tyr	Glu	Thr
		100						105					110		

Leu	Glu	Asn	Gln	Leu	Ala	Phe	Leu	Cys	Gln	Gln	Gly	Phe	Ser	Leu	Glu
					115			120						125	

Asn	Ala	Leu	Tyr	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Gly	His					
				130			135								

<210> 2
 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Dominio de unión a TiP

<400> 2

Met	Trp	Thr	Trp	Asn	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Gly	Gly
1														10	15

Ser

10

<210> 3

<211> 61

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Enlazador de endodomino CD4 modificado

<400> 3

20

Ala	Leu	Ile	Val	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Gly
1				5					10					15	

Leu	Gly	Ile	Phe	Phe	Cys	Val	Arg	Cys	Arg	His	Arg	Arg	Arg	Gln	Ala
						20		25						30	

Glu	Arg	Met	Ala	Gln	Ile	Lys	Arg	Val	Val	Ser	Glu	Lys	Lys	Thr	Ala
		35						40						45	

Gln	Ala	Pro	His	Arg	Phe	Gln	Lys	Thr	Cys	Ser	Pro	Ile			
		50				55			60						

25

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido imitador de biotina, nanotag largo

30

<400> 4

Asp	Val	Glu	Ala	Trp	Leu	Asp	Glu	Arg	Val	Pro	Leu	Val	Glu	Thr	
1					5				10					15	

35

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Péptido imitador de biotina, nanotag corto

<400> 5

Asp Val Glu Ala Trp Leu Gly Ala Arg
 1 5

5 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido imitador de biotina, streptag
 10 <400> 6

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
 1 5

15 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido imitador de biotina, streptagII
 <400> 7

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5

25 <210> 8
 <211> 38
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido imitador de biotina, SBP-tag

35 <400> 8

Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
 1 5 10 15

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
 20 25 30

Gln Gly Gln Arg Glu Pro
 35

40 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido imitador de biotina, ccstreptag
 <400> 9

Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys
 1 5

5 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Péptido imitador de biotina, flankedccstreptag
 10 <400> 10

Ala	Glu	Cys	His	Pro	Gln	Gly	Pro	Pro	Cys	Ile	Glu	Gly	Arg	Lys
1										10				15

15 <210> 11
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia de estreptoavidina central
 <400> 11

Glu	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asn	Gln	Leu	Gly	Ser	Thr	Phe
1										10				15	

Ile	Val	Thr	Ala	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Glu	Ser
										25				30	

Ala	Val	Gly	Asn	Ala	Glu	Ser	Arg	Tyr	Val	Leu	Thr	Gly	Arg	Tyr	Asp
						35			40				45		

Ser	Ala	Pro	Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Thr	Val
						50			55			60			

Ala	Trp	Lys	Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp	Ser
										75				80	

Gly	Gln	Tyr	Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp	Leu
					85					90				95	

Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu	Val
					100					105			110	

Gly	His	Asp	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser
						115		120					125

25 <210> 12
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> péptido de señal

5
 <400> 12

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

10
 Asp His Ala Asp Gly
 20

5
 <210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> péptido de señal

15
 <400> 13

Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

20
 His Ala Ala Arg Pro
 20

20
 <210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> péptido de señal

25
 <400> 14

Met Ala Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

30
 Asp Ala Arg Cys
 20

<210> 15

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> secuencia espaciadora, bisagra-CH2CH3 de IgG1 humana
 <400> 15

Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
1				5					10					15	
Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
								20				25		30	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
								35			40		45		
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
								50			55		60		
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Gln	
								65			75		80		
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
								85			90		95		
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
								100			105		110		
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
								115			120		125		
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
								130			135		140		
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
								145			150		155		
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
								165			170		175		
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
								180			185		190		
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
								195			200		205		
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
								210			215		220		
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp						
								225			230				

<210> 16
<211> 46

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia espaciadora, tallo de CD8 humano

<400> 16

Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
1									10					15	

Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly
								25					30		

Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile
								40				45	

10

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia espaciadora, bisagra de IgGI humana

<400> 17

20

Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
1								10					15		

Lys	Asp	Pro	Lys
20			

<210> 18

<211> 185

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia espaciadora, ectodominio de CD2

30

<400> 18

Lys	Glu	Ile	Thr	Asn	Ala	Leu	Glu	Thr	Trp	Gly	Ala	Leu	Gly	Gln	Asp
1								10					15		

Ile	Asn	Leu	Asp	Ile	Pro	Ser	Phe	Gln	Met	Ser	Asp	Asp	Ile	Asp	Asp
								25					30		

Ile	Lys	Trp	Glu	Lys	Thr	Ser	Asp	Lys	Lys	Ile	Ala	Gln	Phe	Arg
								40					45	

Lys	Glu	Lys	Glu	Thr	Phe	Lys	Glu	Lys	Asp	Thr	Tyr	Lys	Leu	Phe	Lys
								55					60		

ES 2 910 008 T3

Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
65 70 75 80

Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
85 90 95

Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser
100 105 110

Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr
115 120 125

Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser
130 135 140

Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe
145 150 155 160

Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro
165 170 175

Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp
180 185

<210> 19

<211> 259

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia espaciadora, ectodominio de CD34

10

<400> 19

ES 2 910 008 T3

Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly
1 5 10 15

Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr
20 25 30

Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly
35 40 45

Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser
50 55 60

Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln
65 70 75 80

Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val
 85 90 95

Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val
 100 105 110

Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys
 115 120 125

Pro Tyr Thr Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile
 130 135 140

Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu
 145 150 155 160

Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly
 165 170 175

Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp
 180 185 190

Ala Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg
 195 200 205

Pro Gln Cys Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser
 210 215 220

Lys Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly
 225 230 235 240

Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser
 245 250 255

Gln Lys Thr

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> componente de señalización, endodomino Z de CD3

10

<400> 20

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 21

<211> 152

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> componente de señalización, endodomelios Zeta de CD28 y CD3

10

<400> 21

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
 20 25 30

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 35 40 45

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 50 55 60

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 65 70 75 80

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 85 90 95

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 100 105 110

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly

115 120 125

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 130 135 140

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 145 150

<210> 22

<211> 188

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> componente de señalización, endodomios Zeta de CD28, 0X40 y CD3

<400> 22

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
 20 25 30

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp
 35 40 45

Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu
 50 55 60

Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe
 65 70 75 80

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 85 90 95

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 100 105 110

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 115 120 125

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 130 135 140

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 145 150 155 160

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 165 170 175

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 180 185

<210> 23

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> sitio de autoescisión, péptido de autoescisión 2a

<400> 23

Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 24

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sitio de autoescisión, péptido de autoescisión 2a

10

<400> 24

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

15

<210> 25

<211> 652

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> secuencia del receptor antigénico quimérico (CAR)

<400> 25

ES 2 910 008 T3

Met Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
20 25 30

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
35 40 45

ES 2 910 008 T3

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
50 55 60

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
65 70 75 80

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
85 90 95

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
100 105 110

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Glu Gly Arg Gly
115 120 125

Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala
130 135 140

Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala
145 150 155 160

Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
165 170 175

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr
180 185 190

Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
195 200 205

Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
210 215 220

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
225 230 235 240

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr
245 250 255

Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275 280 285

Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
290 295 300

ES 2 910 008 T3

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
305 310 315 320

Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys
325 330 335

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser Thr Tyr
340 345 350

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
355 360 365

Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
370 375 380

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly Tyr Phe
385 390 395 400

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met Asp Pro
405 410 415

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
420 425 430

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
435 440 445

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
450 455 460

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
465 470 475 480

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
485 490 495

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
500 505 510

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
515 520 525

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
530 535 540

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

545	550	555	560
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
565 570 575			
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
580 585 590			
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
595 600 605			
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
610 615 620			
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
625 630 635 640			
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Met			
645 650			
<210> 26			
<211> 213			
5	<212> PRT		
<213> Secuencia artificial			
<220>			
<223> secuencia del receptor antigénico químérico (CAR)			
10	<400> 26		
Ser Gly Gly Gly Ser Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile			
1 5 10 15			
Asn Ser Ala Leu Glu Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr			
20 25 30			
Thr Arg Lys Leu Ala Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr			
35 40 45			
Trp His Val Lys Asn Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu			
50 55 60			
Met Leu Asp Arg His His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser			
65 70 75 80			
Trp Gln Asp Phe Leu Arg Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu			
85 90 95			
Leu Ser His Arg Asp Gly Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr			
100 105 110			

Glu Lys Gln Tyr Glu Thr Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln
 115 120 125

Gln Gly Phe Ser Leu Glu Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly
 130 135 140

His Phe Thr Leu Gly Cys Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala
 145 150 155 160

Lys Glu Glu Arg Glu Thr Pro Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu
 165 170 175

Arg Gln Ala Ile Glu Leu Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe
 180 185 190

Leu Phe Gly Leu Glu Leu Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys
 195 200 205

Cys Glu Ser Gly Ser
 210

<210> 27

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de TiP

10 <400> 27

Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Ser
 1 5 10 15

15 <210> 28

<211> 87

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 28

ES 2 910 008 T3

Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu
1 5 10 15

Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Met Ala Leu Ile Val Leu Gly
20 25 30

Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys
35 40 45

Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile
50 55 60

Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg Phe
65 70 75 80

Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile
85

5 <210> 29
<211> 926
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de TetCAR básica
<400> 29

ES 2 910 008 T3

Met Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
20 25 30

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
35 40 45

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
50 55 60

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
65 70 75 80

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
85 90 95

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
100 105 110

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Glu Gly Arg Gly
115 120 125

Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala
130 135 140

Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala
145 150 155 160

Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

ES 2 910 008 T3

165

170

175

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr
180 185 190

Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
195 200 205

Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
210 215 220

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
225 230 235 240

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr
245 250 255

Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275 280 285

Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu
290 295 300

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
305 310 315 320

Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys
325 330 335

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser Thr Tyr
340 345 350

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
355 360 365

Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
370 375 380

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly Tyr Phe
385 390 395 400

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met Asp Pro
405 410 415

ES 2 910 008 T3

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
420 425 430

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
435 440 445

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
450 455 460

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
465 470 475 480

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
485 490 495

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
500 505 510

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
515 520 525

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
530 535 540

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
545 550 555 560

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
565 570 575

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
580 585 590

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
595 600 605

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
610 615 620

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
625 630 635 640

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Met Ala Leu Ile Val
645 650 655

Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe
660 665 670

ES 2 910 008 T3

Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ala
675 680 685

Gln Ile Lys Arg Val Val Ser Glu Lys Lys Thr Ala Gln Ala Pro His
690 695 700

Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile Ser Gly Gly Gly Ser Met
705 710 715 720

Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu Leu
725 730 735

Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln Lys
740 745 750

Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys Arg
755 760 765

Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His Thr
770 775 780

His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg Asn
785 790 795 800

Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly Ala
805 810 815

Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr Leu
820 825 830

Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu Asn
835 840 845

Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly Cys Val
850 855 860

Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr Pro
865 870 875 880

Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu Phe
885 890 895

Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu Ile
900 905 910

Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser
915 920 925

REIVINDICACIONES

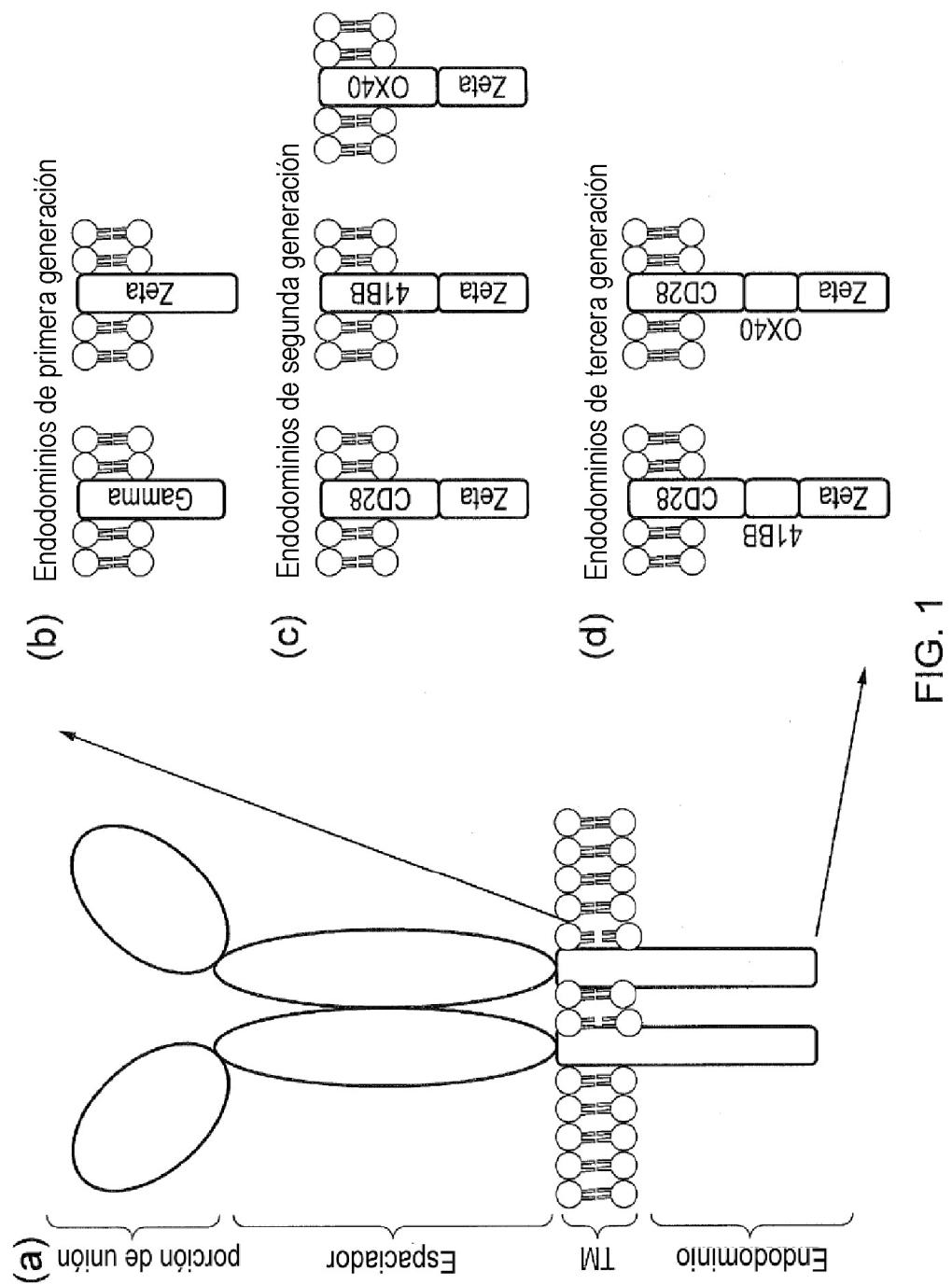
1. Un sistema de receptores antigenicos quimericos (CAR) que comprende:
 - (i) un componente receptor que comprende un dominio de union a antigenos, un dominio transmembranal y un primer dominio de union; y
 - (ii) un componente de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización y un segundo dominio de unión que se une específicamente al primer dominio de unión del componente receptor;

en donde la unión del primer y segundo dominios de unión se desorganiza por la presencia de un agente, de tal forma que, en ausencia del agente, el componente receptor y el componente de señalización se heterodimerizan y la unión del dominio de unión a antigenos al antigeno tiene como resultado la señalización a través del dominio de señalización, en tanto que, en presencia del agente, el componente receptor y el componente de señalización no se heterodimerizan y la unión del dominio de unión a antigenos al antigeno no tiene como resultado la señalización a través del dominio de señalización, en donde el primer dominio de unión comprende la Proteína Represora de Tet (TetR) y el segundo dominio de unión comprende el péptido inductor de la Transcripción (TiP); o en donde el primer dominio de unión comprende TiP y el segundo dominio de unión comprende TetR; y el agente es tetraciclina, doxiciclina o minociclina o un análogo de las mismas.
2. Un sistema de CAR de conformidad con la reivindicación 1, en donde el dominio de señalización del componente de señalización comprende un solo endodomino seleccionado del endodomino de CD3 zeta, endodomino de CD28, endodomino de 41BB y endodomino de OX40.
3. Un sistema de CAR de conformidad con cualquier reivindicación precedente, en donde el dominio de señalización del componente de señalización comprende por lo menos uno del endodomino de CD3 zeta, endodomino de CD28, endodomino de 41BB y endodomino de OX40.
4. Un sistema de CAR de conformidad con cualquier reivindicación precedente, el cual comprende una pluralidad de componentes de señalización, y cada uno comprende un dominio de señalización y dominio de unión, en donde los dominios de unión reconocen, cada uno, el mismo dominio de unión del componente receptor, pero los dominios de señalización comprenden diferentes endodomios.
5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un sistema de señalización de CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el componente receptor y componente de señalización se coexpresan por medio de un péptido de autoescisión, el cual se escinde entre el componente receptor y el componente de señalización después de la traducción.
6. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Un vector retroviral o un vector lentiviral o un transposón que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Una célula T o célula NK que expresa un sistema de señalización de CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Una célula T o célula NK de conformidad con la reivindicación 8, la cual comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, o un vector de acuerdo con la reivindicación 6 o 7.
10. Una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células T o células NK de acuerdo con la reivindicación 8 o 9.
11. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 10 para su uso en un método para tratar cáncer.
12. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el método comprende las siguientes etapas:
 - (i) aislamiento de una muestra que contiene células T o NK;
 - (ii) transducción o transfección de las células T o NK con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, o un vector de acuerdo con la reivindicación 6 o 7; y
 - (iii) administrar las células T o células NK de (ii) a un sujeto.
13. Un equipo que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, o un vector de

acuerdo con la reivindicación 6 o 7.

14. Un método para producir una célula T o NK de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, el cual comprende la etapa de introducir una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, o el vector de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en una célula T o NK *ex vivo*.

5 15. El método de conformidad con la reivindicación 14, en donde la célula T o NK es de una muestra aislada de un sujeto.



(a) WTWNAYAAPS-GGGS- Proteína

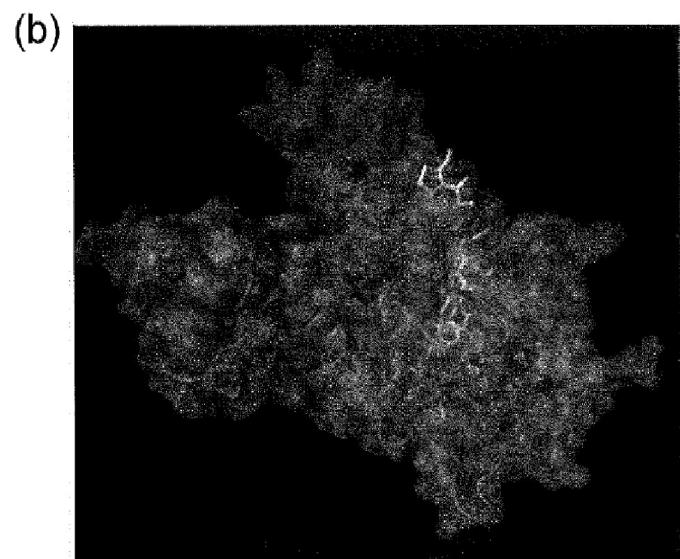
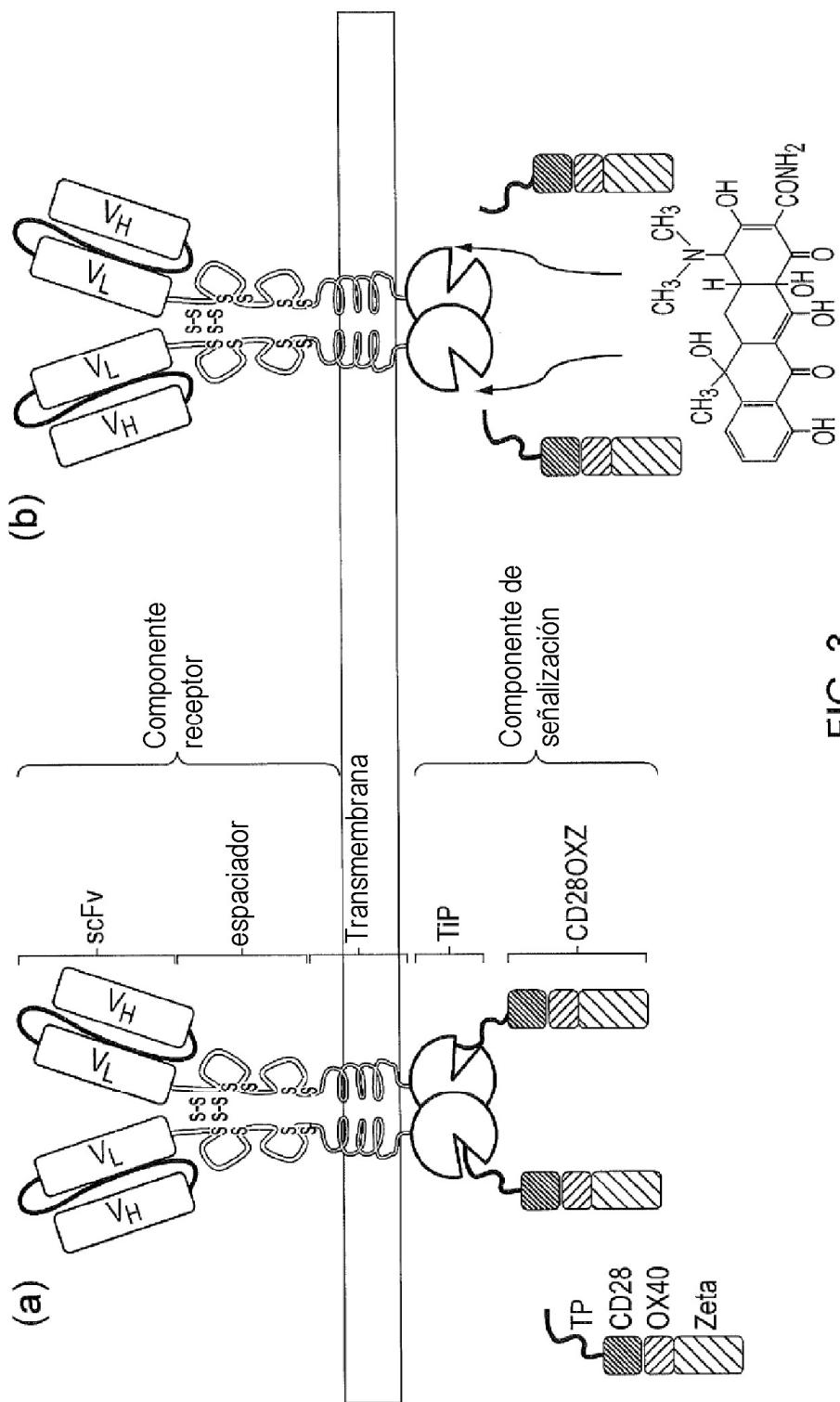


FIG. 2



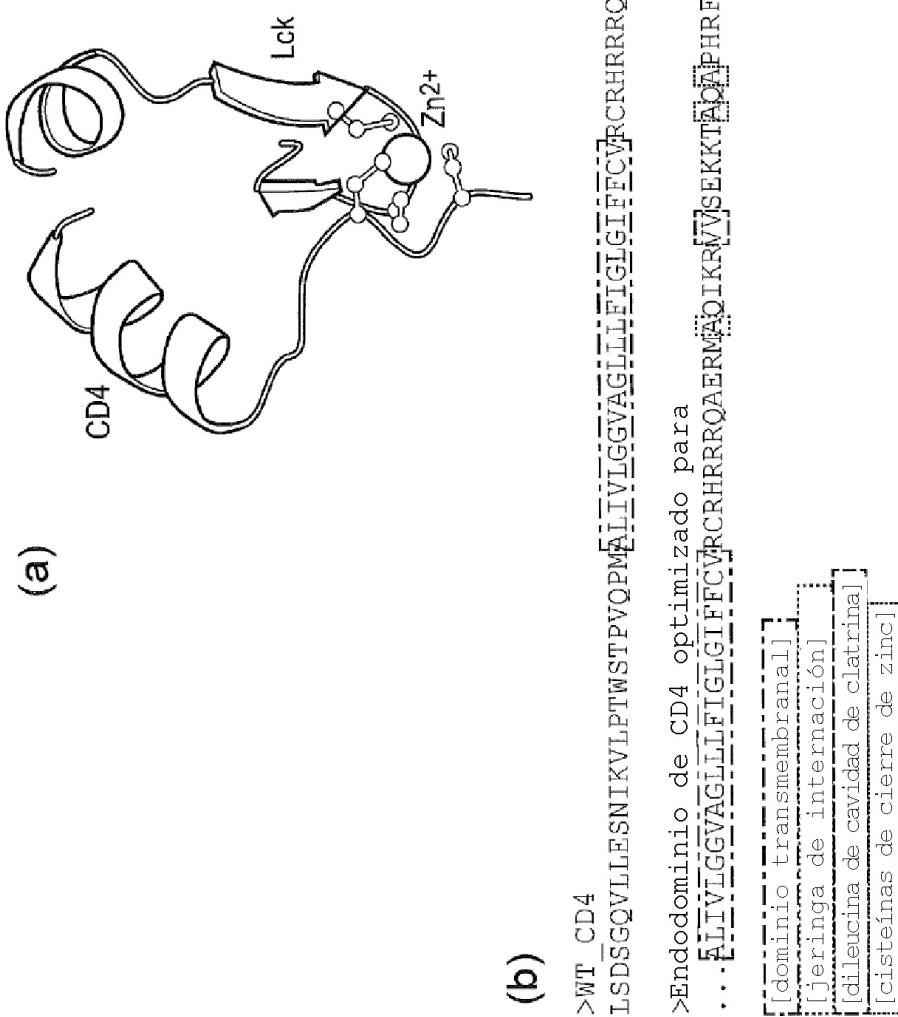
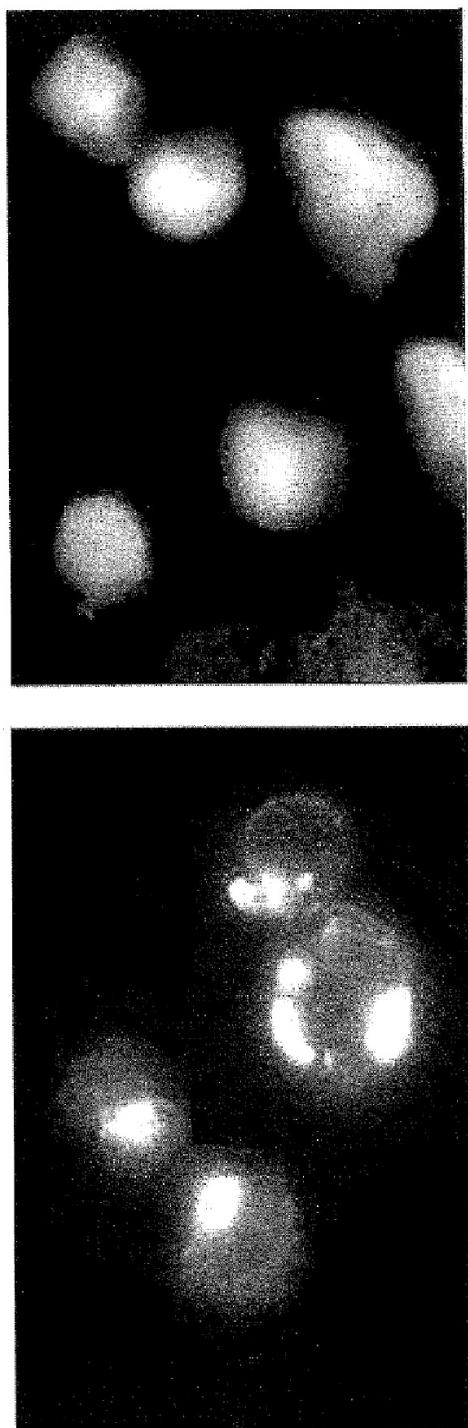
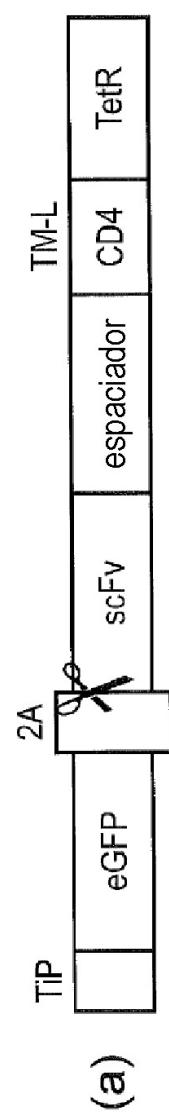
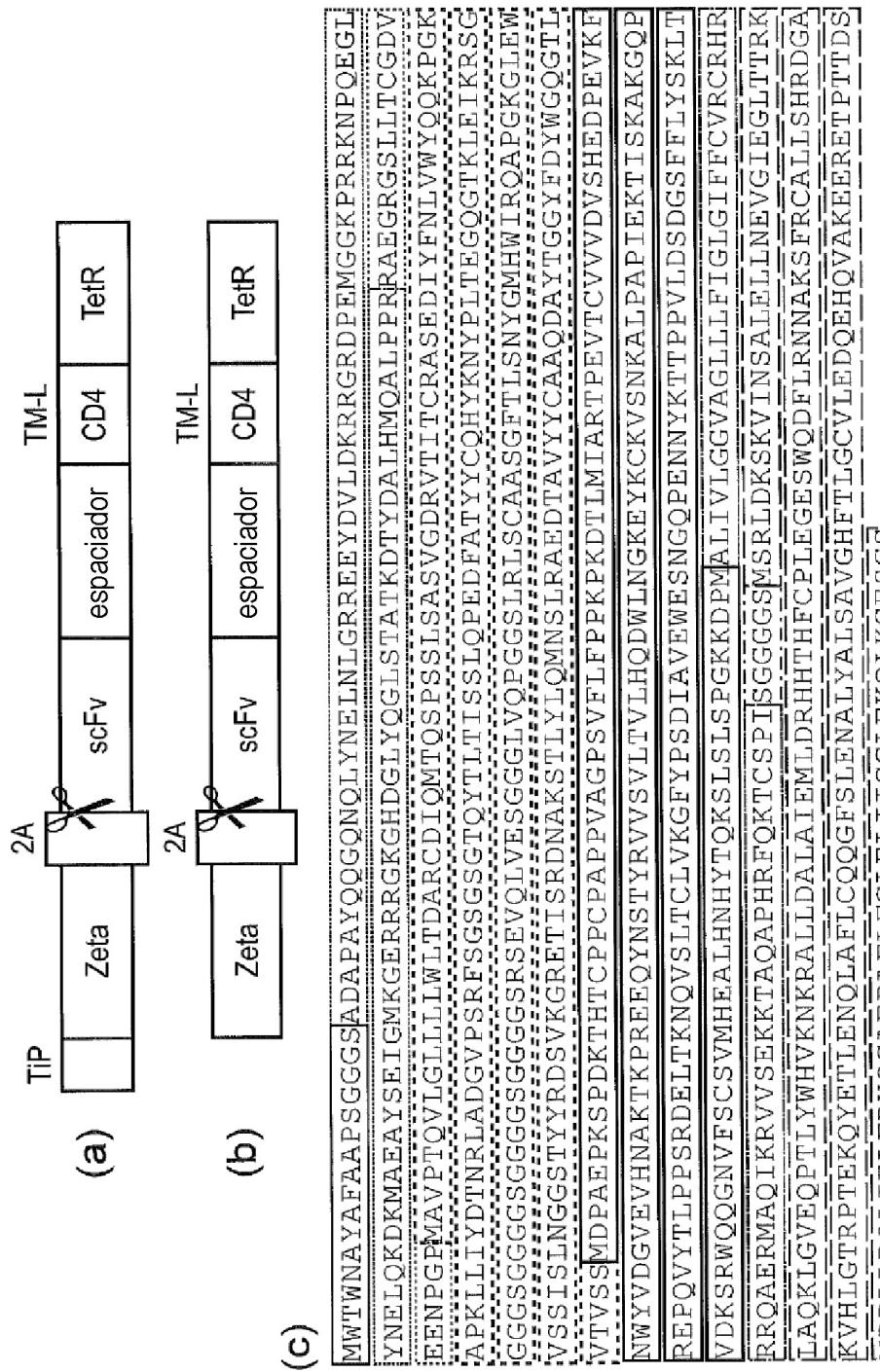


FIG. 4



(b) Sin tetracicina
(c) Tetracicina

FIG. 5



[Tip] [CD3Zeta] [2A] [scFv] [HCH2CH3pva] [CD4tm-endo] [enlazador] [TetR]

6
G
H

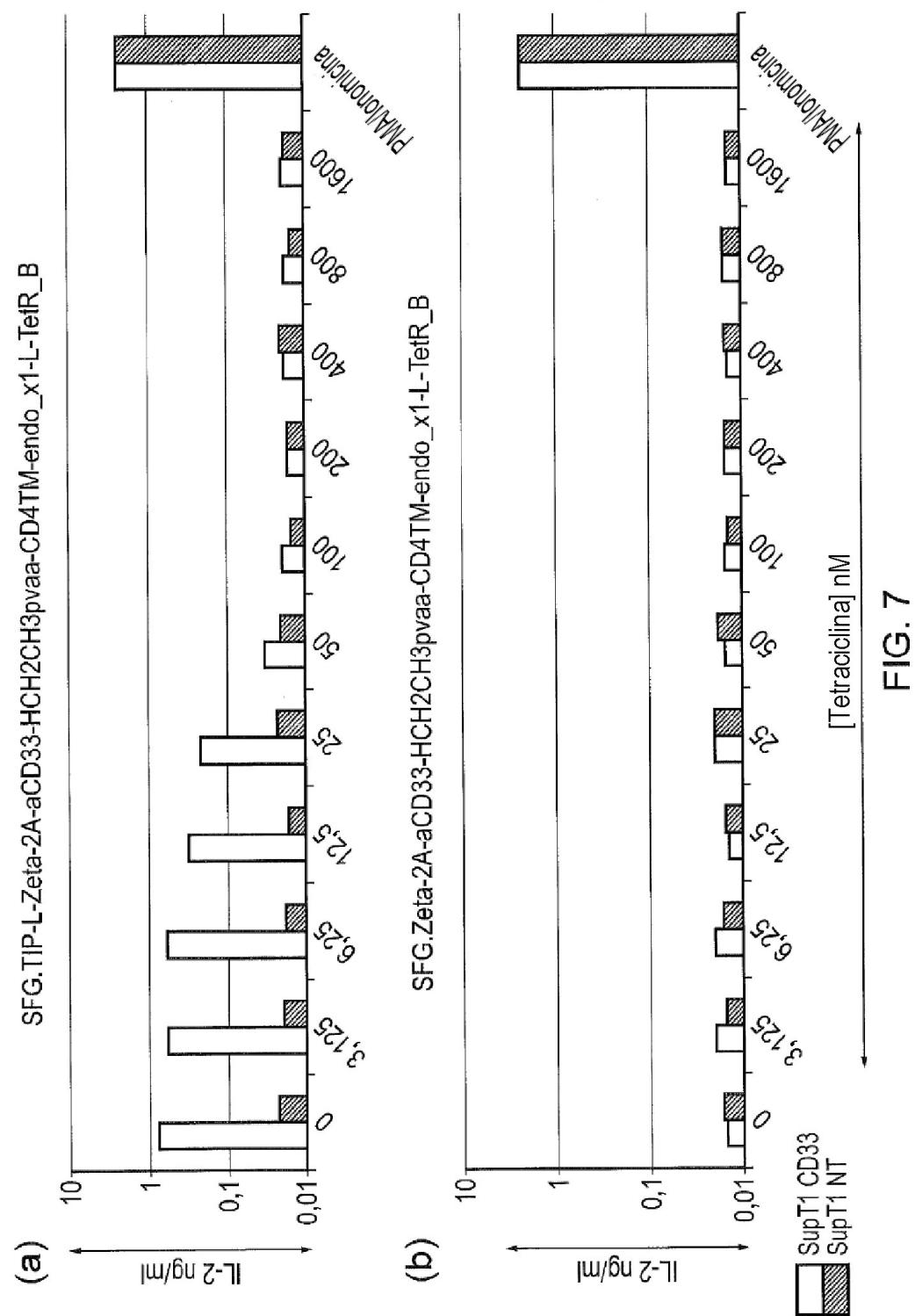


FIG. 7

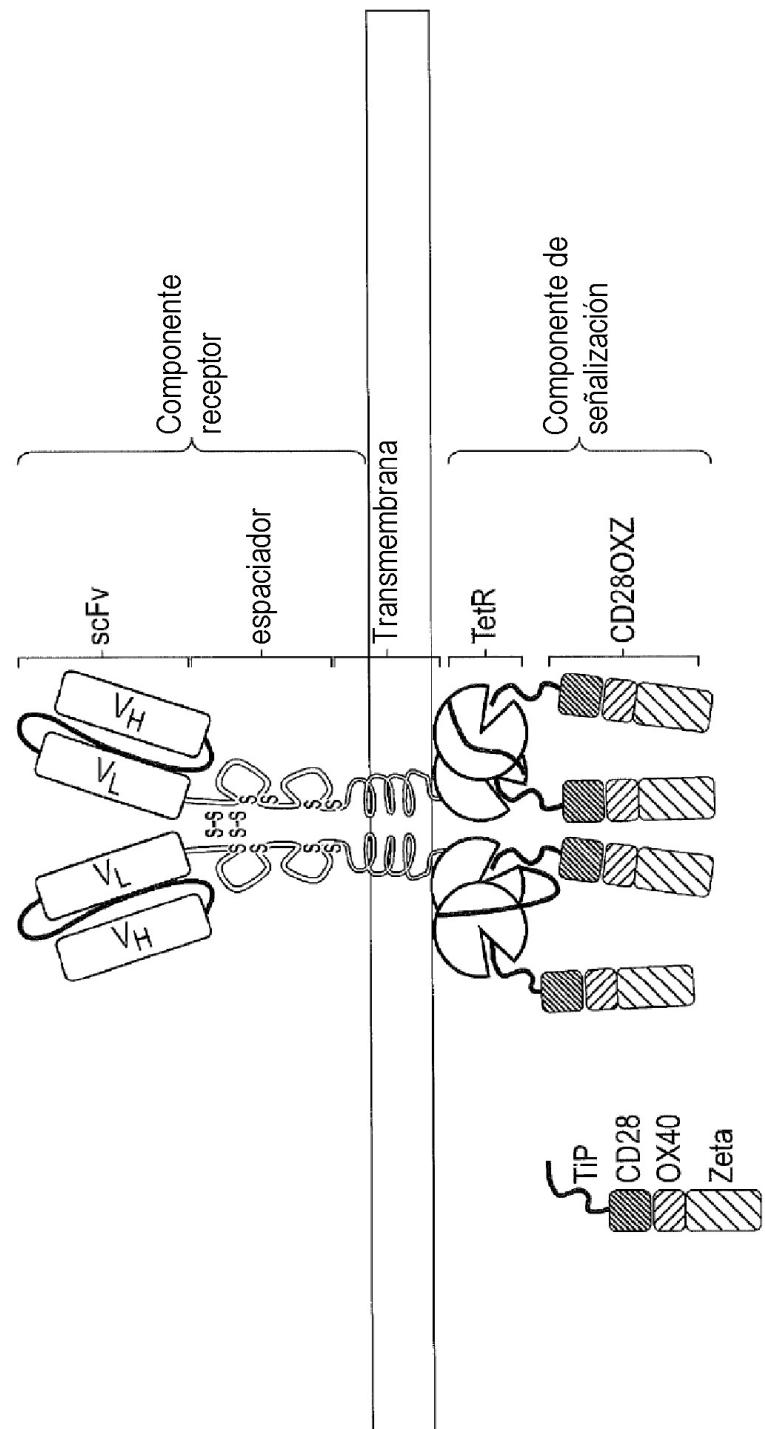


FIG. 8

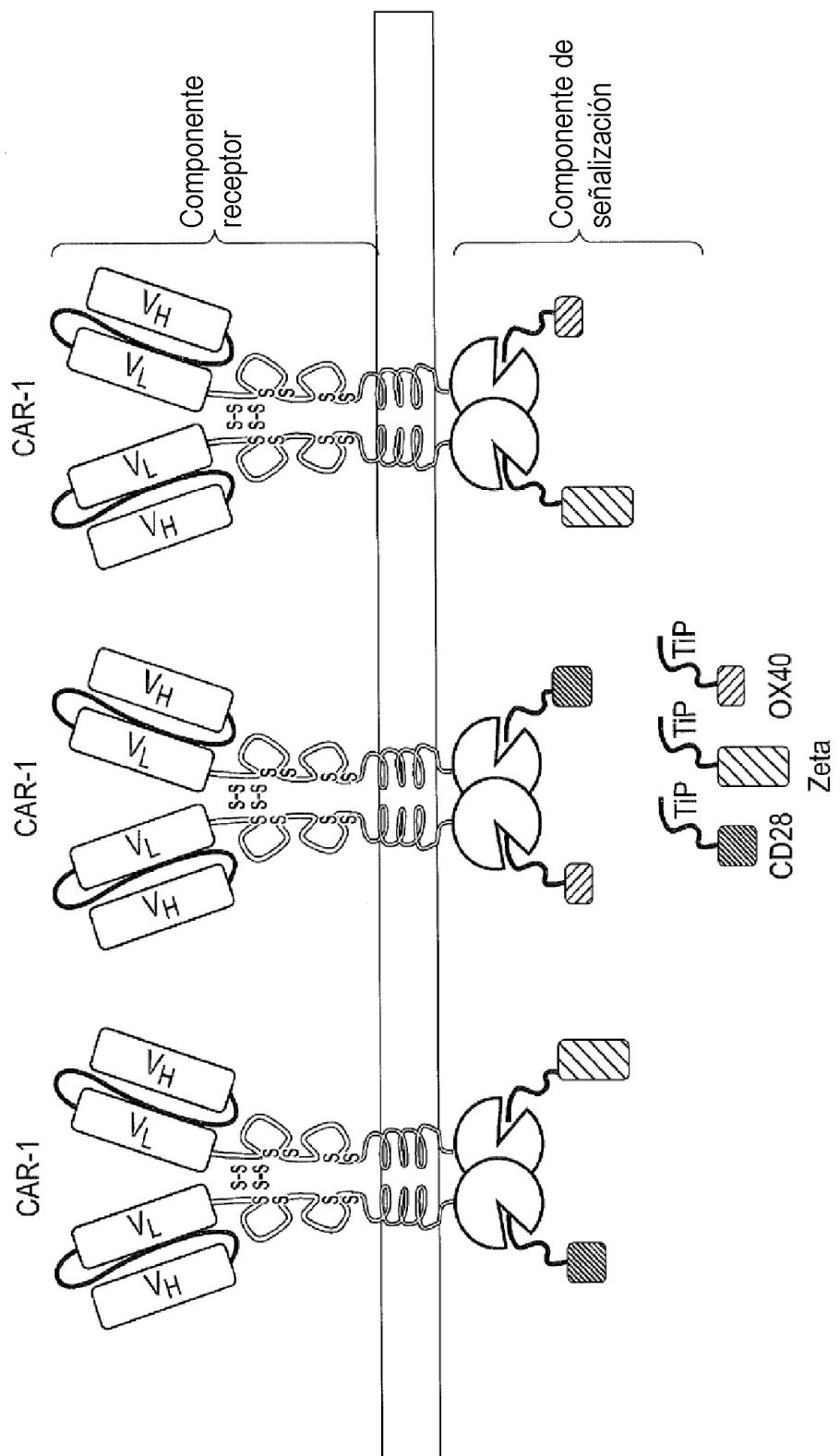


FIG. 9

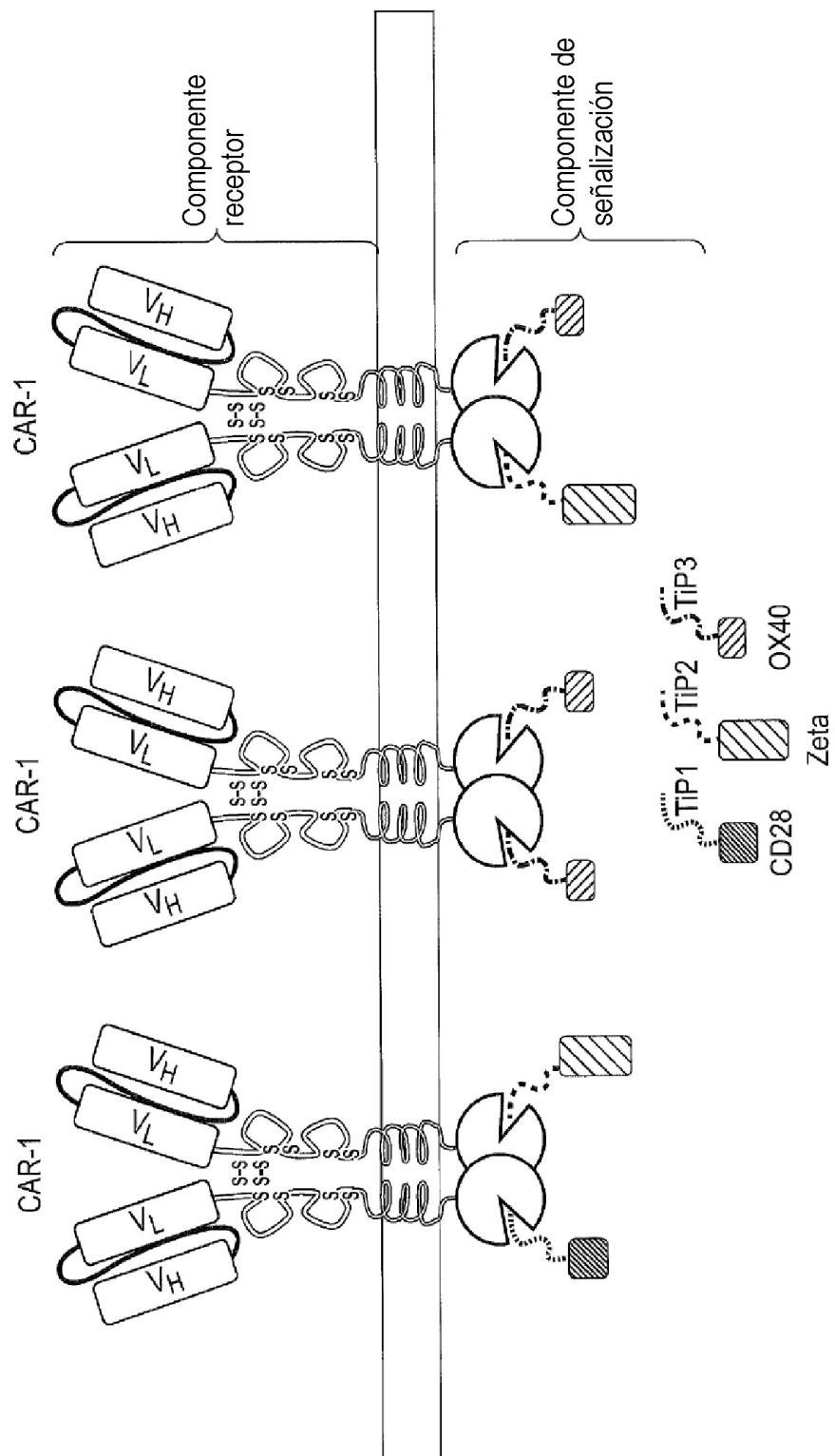


FIG. 10

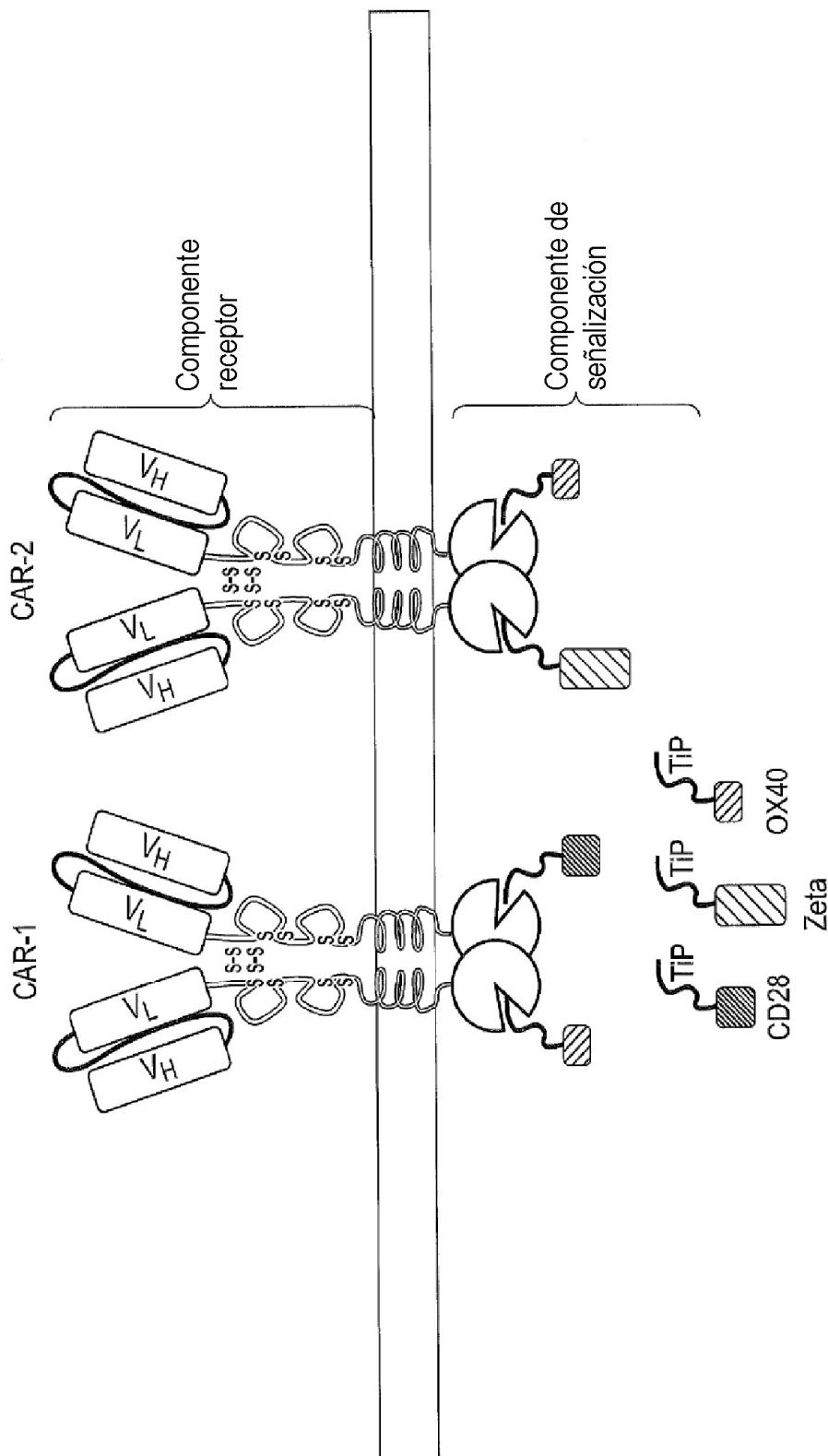


FIG. 11

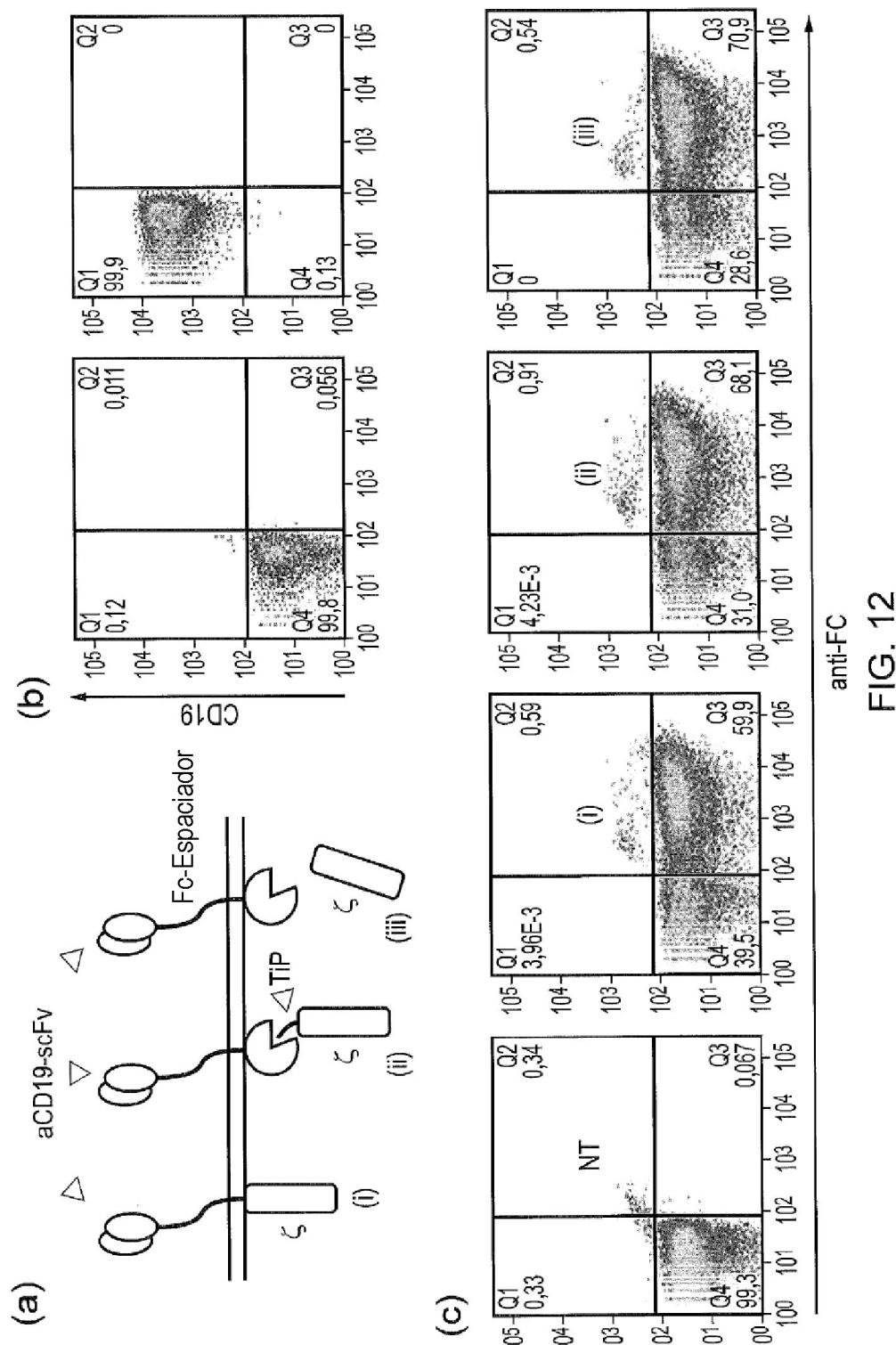


FIG. 12

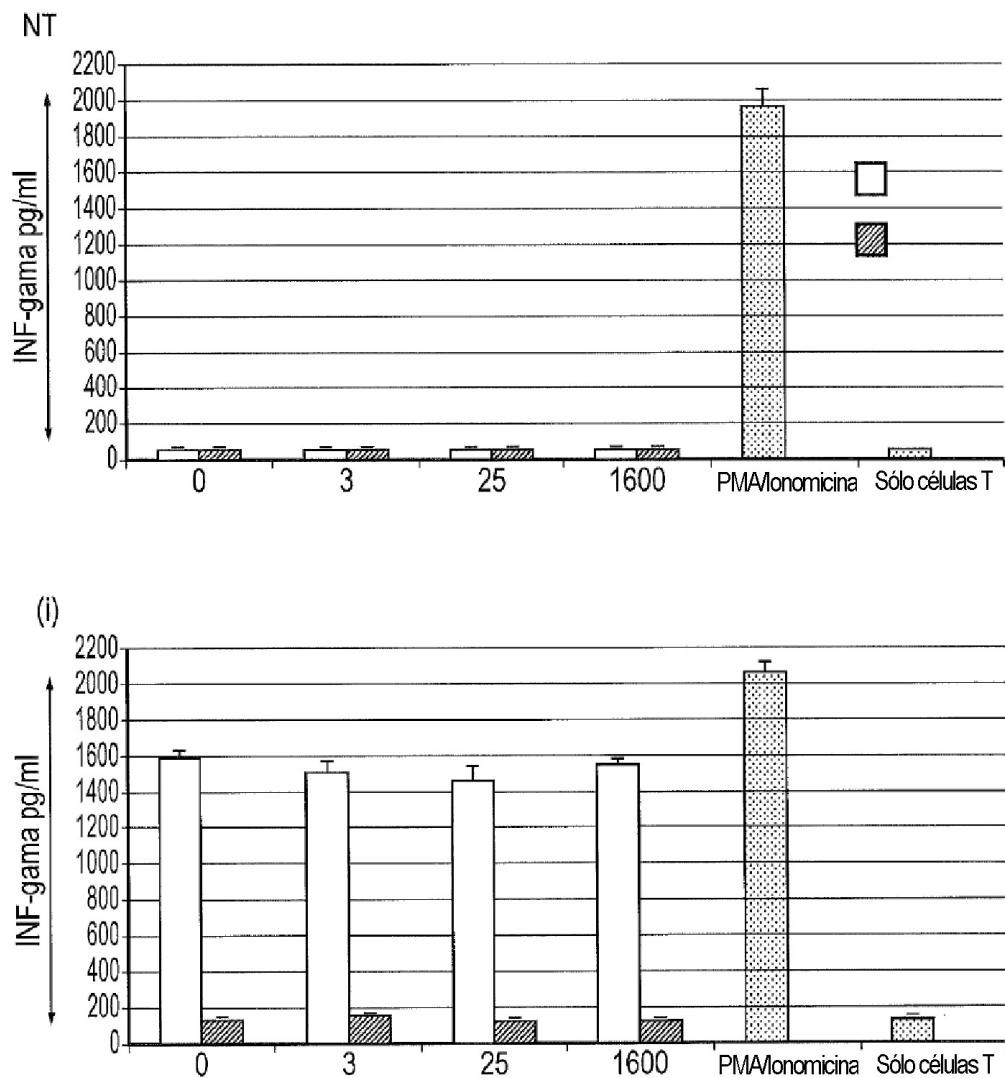


FIG. 13

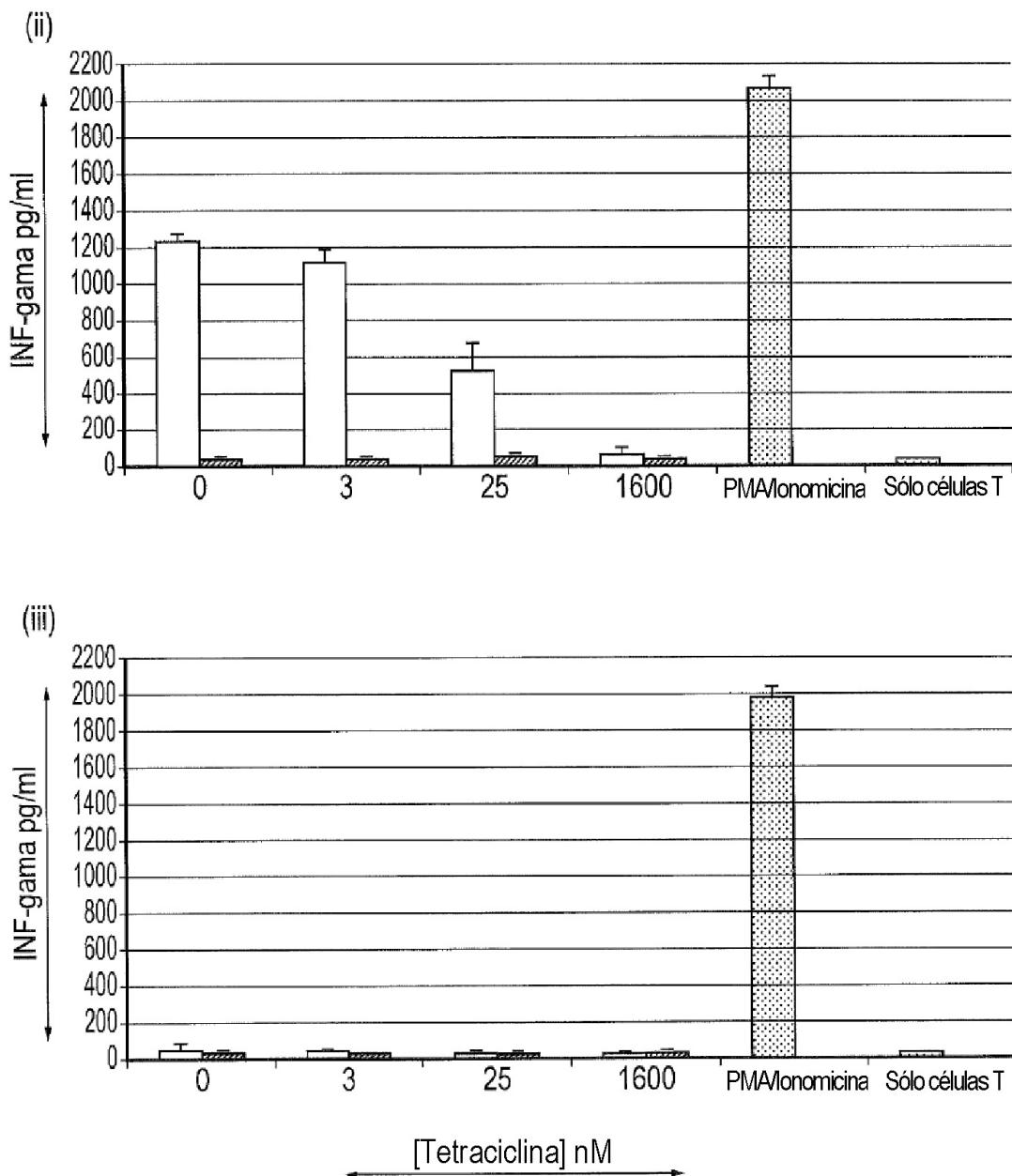


FIG. 13 (Continuación)

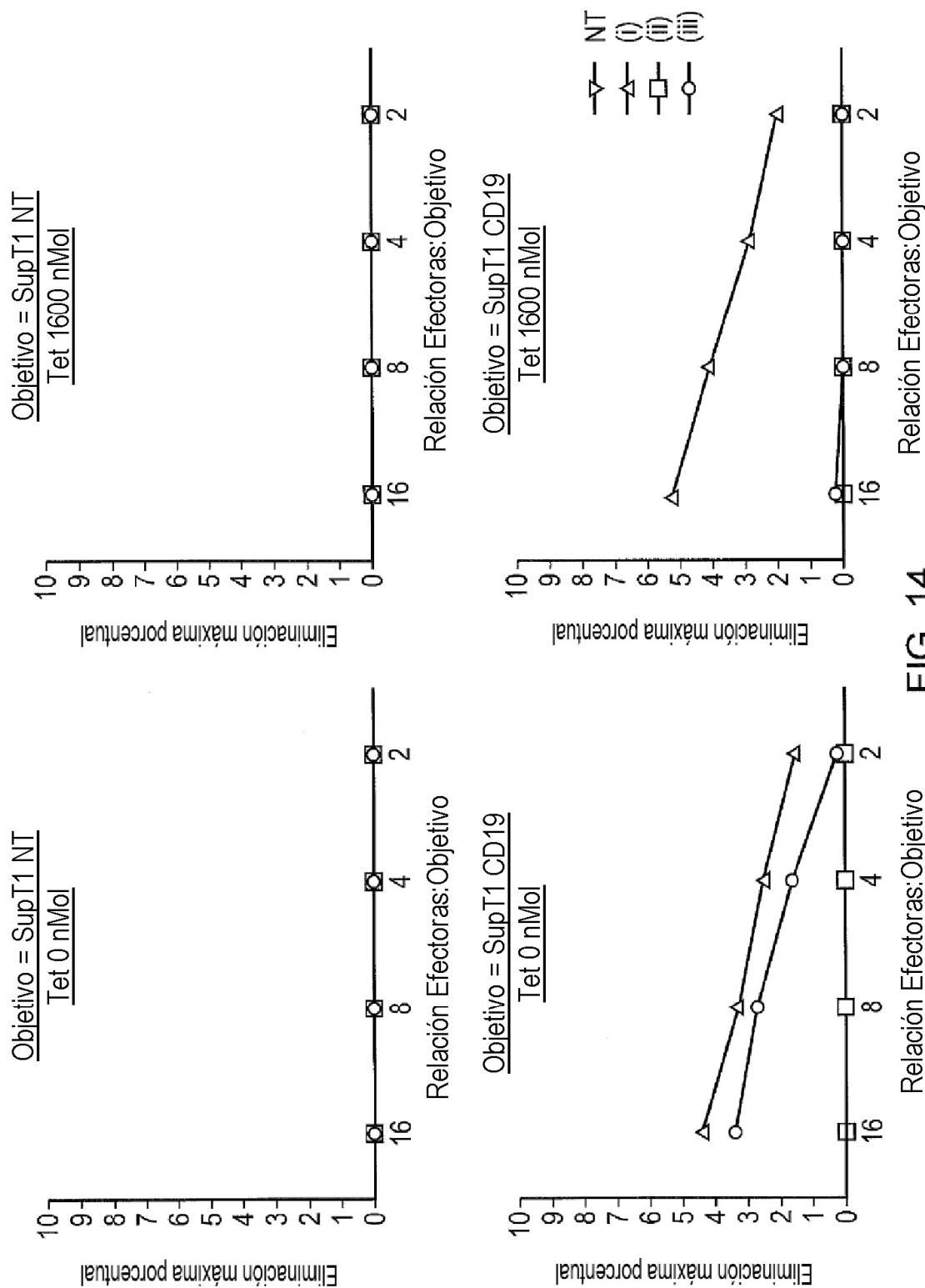


FIG. 14