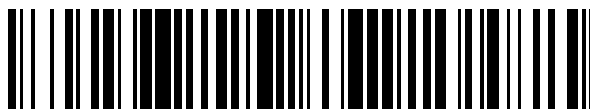


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 338**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2016** **PCT/GB2016/051576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** **WO16193696**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2016** **E 16726416 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 3303568**

54 Título: **Célula**

30 Prioridad:

01.06.2015 GB 201509413

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

03.11.2020

73 Titular/es:

UCL BUSINESS LTD (100.0%)
The Network Building, 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB

72 Inventor/es:

PULÉ, MARTIN;
CORDOBA, SHAUN;
THOMAS, SIMON y
KONG, KHAI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 791 338 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

Célula

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas de fusión y a proteínas truncadas que permiten manipular o modular las rutas de señalización que se propagan tras la activación de las células inmunitarias.

10 **Antecedentes de la invención**

La inmunoterapia adoptiva con células T autólogas implica el aislamiento de las células T a partir del paciente seguido de su estimulación, modificación y/o expansión *ex vivo* con el fin de generar una población de células T que muestra especificidades antitumorales. Una vez reinfundidas en el paciente, dichas células son capaces de reconocer los antígenos expresados en el tumor y que median en el rechazo tumoral.

Este enfoque ya se ha demostrado en varios ensayos en diferentes contextos que presenta el potencial de ser un tratamiento potente, eficaz y duradero para el cáncer. Por ejemplo, los tumores controlados por el VEB, tal como la enfermedad linfoproliferativa secundaria al trasplante de un órgano sólido, puede tratarse eficazmente con células T específicas de VEB expandidas *ex vivo*.

Una terapia similar para las neoplasias malignas no víricas implica linfocitos infiltrantes de tumor (LIT), que se aíslan a partir de fragmentos resecados de tumor y después se someten a estimulación y expansión con muestras de tumor autólogo. Los cultivos de células T expandidos que muestran reactividad tumoral a continuación pueden reinfundirse en el paciente.

Al contrario que seleccionando y refinando las especificidades de las células T con la exposición repetida a antígenos, puede proporcionarse la especificidad antitumoral deseada a las células T mediante modificación génica e introducción de un receptor de células T (RCT) específico tumoral o un receptor de antígeno quimérico (RAQ). Estas células se expanden *ex vivo* con el fin de producir un número suficiente de células para conseguir respuestas clínicas significativas en el paciente.

Sin embargo, los enfoques detallados anteriormente adolecen de limitaciones. Por ejemplo, las células T transferidas adoptivamente pueden mostrar una persistencia y expansión *in vivo* limitadas debido a una señalización, falta de IL-2 o diferenciación insuficiente. A título de ejemplo adicional, las células T transferidas adoptivamente pueden sucumbir a los estímulos inhibitorios dentro del microambiente tumoral. Por ejemplo, pueden agotarse, experimentar muerte celular inducida por activación como consecuencia de la sobreactivación, o pueden causar efectos en dianas fuera del tumor.

Otro enfoque prometedor de la activación de la inmunidad antitumoral terapéutica es el bloqueo de los puntos de control inmunitario. Los puntos de control inmunitario se refieren a las diversas rutas inhibitorias del sistema inmunitario que resultan importantes para mantener la autotolerancia y modular la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas en tejidos periféricos.

Es conocido que los tumores explotan determinadas rutas de punto de control inmunitario como mecanismo principal de resistencia inmunitaria, particularmente contra células T que son específicas para antígenos tumorales. Muchos de los puntos de control inmunitario resultan iniciados por interacciones de ligando-receptor, lo que implican que pueden resultar bloqueados por anticuerpos o modulados por formas recombinantes de ligandos o receptores. Los anticuerpos citotóxicos del antígeno 4 asociado a linfocitos T (CTLA4) son los primeros de dicha clase de inmunoterapéuticos en conseguir la autorización de la US Food and Drug Administration (FDA). Más recientemente, se han desarrollado bloqueantes de proteínas adicionales de punto de control inmunitario, tales como la proteína 1 de muerte celular programada (PD1), y se ha demostrado que potencian la inmunidad antitumoral. John *et al.* (John *et al.*, *Oncolmunology*, 2: 10, e26286, 2013) han dado a conocer que el bloqueo de la inmunosupresión de PD-1 refuerza la terapia de células T RAQ.

Un problema de la utilización de los inhibidores de punto de control inmunitario es que existe una multitud de rutas inhibitorias inducidas por una multitud de interacciones de ligando:receptor. La utilización de un anticuerpo o de una forma recombinante del ligando/receptor sólo bloqueará una de dichas rutas inhibitorias, dejando la posibilidad abierta de que el tumor pueda compensar el bloqueo de punto de control inmunitario específico utilizando otras moléculas.

60 **Descripción resumida de aspectos de la invención**

Los presentes inventores han desarrollado un sistema para modular y/o manipular las rutas de transducción de señales en células inmunitarias, tales como células T y células asesinas naturales (NK).

Las rutas de señalización intracelular resultan iniciadas y controladas por la modificación post-traducciona reversible

de las proteínas. Los presentes inventores han determinado que las rutas de señalización activadoras e inhibidoras en las células T pueden resultar moduladas y/o manipuladas por proteínas de fusión o proteínas truncadas que comprenden dominios SH2 procedentes de proteínas de transducción de señales inmediatas de células T. En otras palabras, las rutas de señalización activadoras e inhibidoras en las células T pueden modularse y/o manipularse con proteínas de fusión o proteínas truncadas que comprenden dominios SH2 de proteínas que son capaces de unirse a motivos inmunorreceptores de activación a base de tirosinas fosforiladas (ITAM, por sus siglas en inglés) o motivos inmunorreceptores de inactivación a base de tirosinas fosforiladas (ITIM).

La invención proporciona una célula que comprende un receptor de antígeno quimérico (RAQ) y una proteína truncada que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo inmunorreceptor de inactivación a base de tirosinas (ITIM) pero que no presenta un dominio de fosfatasa.

En algunas realizaciones, la proteína truncada comprende el dominio SH2 de PTPN6 pero no presenta el dominio de fosfatasa de PTPN6.

En algunas realizaciones, la proteína truncada comprende el dominio SH2 de SHP-2 pero no presenta el dominio de fosfatasa de SHP-2.

En algunas realizaciones, la proteína truncada comprende la secuencia mostrada en SEC ID nº 6 o una o ambas secuencias mostradas en SEC ID nº 7 y nº 8.

En algunas realizaciones, la proteína truncada comprende o consiste en la secuencia mostrada en SEC ID nº 10, nº 11 o nº 12.

La invención proporciona además un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína truncada según la invención y una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un receptor de antígeno quimérico.

La invención proporciona además un vector que comprende un constructo de ácidos nucleicos según la invención.

La invención proporciona además un conjunto de vectores que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína truncada según la invención y una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un receptor de antígeno quimérico.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células según la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica según la invención para la utilización en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.

En algunas realizaciones, el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad comprende las etapas siguientes:

- (i) provisión de una muestra que contiene células a partir de un sujeto,
- (ii) transducción o transfección de las células con un constructo de ácidos nucleicos según la invención, un vector según la invención o un juego de vectores según la invención, y
- (iii) administración de las células de (ii) en el sujeto.

En algunas realizaciones, la enfermedad es el cáncer.

La invención proporciona además un método para producir una célula según la invención, que comprende la etapa de introducir: un constructo de ácidos nucleicos según la invención, un vector según la invención o un juego de vectores según la invención, en la célula *ex vivo*.

En algunas realizaciones, la célula es de una muestra aislada a partir de un sujeto.

Descripción de las figuras

Figura 1 (a) - Diagrama de rutas de activación inmediata de células T. La activación de receptores de las células T resulta en la fosforilación de los ITAM. Los ITAM fosforilados resultan reconocidos por los dominios SH2 de ZAP70. Con el reconocimiento, ZAP70 resulta captado en la región yuxtamembranal y su dominio de quinasa seguidamente fosforila LAT. LAT fosforilado es posteriormente reconocido por los dominios SH2 de GRAP, GRB2 y PLC- γ . (b) - Diagrama de rutas de inhibición inmediata de células T. La activación un inmunorreceptor inhibitorio tal como PD1 resulta en la fosforilación de los dominios ITIM. Estos resultan reconocidos por los dominios SH2 de PTPN6. Con el reconocimiento, PTPN6 resulta captado en la región yuxtamembranal y su dominio fosfatasa seguidamente desfosforila dominios ITAM, inhibiendo la activación inmunitaria.

Figura 2 - Diagrama de un sistema de señal de bloqueo - a) ZAP70 truncado que no comprende un dominio de quinasa resulta sobreexpresado. En consecuencia, compite con ZAP70 de longitud completa para los ITAM y reduce la señalización de ITAM. (B) Un PTPN6 truncado que no comprende un dominio de fosfatasa se sobreexpresa, compitiendo para PTPN6 de longitud completa, reduciendo la señalización de ITIM.

Figura 3 - Diagrama de un sistema de señalización de cruce: (a) SH2 de ZAP70 se fusiona con la PTPN6 fosfatasa; por lo tanto, actúa amortiguando la fosforilación de ITAM, ((b) SH2 de PTP6 se fusiona con la ZAP70 quinasa, resultando en la activación paradójica en respuesta a una señal inhibitoria.

Figura 4 - Diagrama de un sistema de señalización amplificada: (a) ZAP70 de longitud completa presenta un endodominio zeta de CD3 unido a su extremo amino-terminal de manera que se ensambla una cascada de ITAM. (b) PTPN6 de longitud completa presenta un endodominio PD1 unido a su extremo amino-terminal de manera que se ensambla una cascada de ITIM.

Figura 5 - Diagrama de ejemplos de un sistema de señalización de derivación: (a) ZAP70 fusionado con endodominio de CD28; (b) ZAP70 fusionado con endodominio de 41BB; (c) ZAP70 fusionado con AKT quinasa; (d) el dominio SH2 de PTPN6 se fusiona con el endodominio 41BB.

Figura 6 - Diagrama de un sistema ilustrativo de señales transcripcionales: a) se coexpresa una fusión ZAP-TeV con un factor de transcripción anclado a membrana que puede liberarse de la membrana mediante corte de su motivo de reconocimiento TeV. Se muestra lo anterior coexpresado con un RAQ de CD19. Por lo tanto, tras el reconocimiento de CD19 sobre una célula diana, la célula T resulta activada y, además, el factor de transcripción se activa. (b) Un sistema alternativo que utiliza alternativamente una fusión de PTPN6-TeV. En la presente memoria, el RAQ consiste en un endodominio portador de ITIM. Por lo tanto, con el reconocimiento de CD19 por el RAQ, el factor de transcripción se activa, aunque es independiente de la activación de las células T.

Figura 7 - Diagrama de un sistema de señalización de castración: se muestran dos RAQ - uno reconoce CD19 y es activador, y uno que reconoce CD33 y es inhibitorio - estas especificidades se proporcionan únicamente a título ilustrativo (a) Y NO castración de señal; se capta una proteína de fusión SH2-TeV en el RAQ ITIM con su activación. Lo anterior resulta en la escisión de los ITAM respecto de un RAQ activador que se construye de manera que un sitio de corte TeV conecta el dominio transmembranal con el dominio ITAM. Por lo tanto, se inhibe el RAQ activador. (b) Y castración de señales: En la presente memoria, se cata una proteína de fusión SH2-TeV en un RAQ ITIM tras su activación. Lo anterior resulta en la liberación de un dominio de fosfatasa respecto de un RAQ activador que se construye de manera que se conecta una fosfatasa a su extremo carboxi-terminal mediante un dominio de corte TeV. Lo anterior resulta en la liberación de la inhibición constitutiva, permitiendo que el RAQ se active en presencia del antígeno afín.

Figura 8 - Se construyeron varias fusiones de diferentes dominios SH2 y dominio de quinasa AKT. ZAP-AKT, GRAP-AKT, GRB-AKT y PLC-γ.

Figura 9(a) Tinción fosfo-AKT de células T transducidas con las diferentes fusiones de SH2/AKT con y sin activación con el anticuerpo mitogénico OKT3. (b) Tinción fosfo-AKT de células T transducidas con fusión ZAP-AKT, una fusión ZAP-AKT mejorada en la que ZAP y AKT se conectan mediante un conector flexible y un ZAP-AKT de control, en el que la sustitución R190K elimina la capacidad de ZAP de unirse a los ITAM. Las células T se estimularon con OKT3 o no se estimularon con OKT3. Los gráficos de facs se superpusieron sobre los de las células T no transducidas.

Figura 10(a). Transferencia fosfo-AKT de células T activadas con cantidades crecientes de OKT3. (B) Microscopía de ZAP-AKT o células T de control no estimuladas, estimuladas con solo OKT3 o estimuladas con OKT3 e IL-2. Las células T ZAP-AKT estimuladas con solo OKT3 son similares a las células T no transducidas estimuladas con OKT3 e IL2.

Figura 11(a). Implementación del interruptor transcripcional de TeV directo. Se sustituye un endodominio de RAQ de CD19 con la proteasa TeV. También se coexpresa un factor de transcripción VP16/GAL4 anclado a membrana. Un informador de luciferasa detecta la actividad de VP16/GAL5. (b) Implementación con ZAP-TeV. Se coexpresa un RAQ de CD19 estándar con la fusión ZAP-TeV junto con el factor de transcripción anclado a membrana.

Figura 12. Actividad de interruptores transcripcionales basados en ZAP-TeV y células T expresantes de control tras la exposición a dianas negativas para CD19 (izquierda) o positivas para CD19 (derecha). La actividad se mide a partir de la producción de luz tras la adición de luciferasa. En orden, las condiciones sometidas a ensayo son: (a) RAQ aCD19 coexpresado con ZAP-TeV, (b) RAQ aCD19 coexpresado con (R190K) inactivo, (c) RAQ aCD19 coexpresado con ZAP-TeV y el factor de transcripción anclado a membrana, (d) RAQ aCD19 coexpresado con (R190K) ZAP-TEV inactivo coexpresado con el factor de transcripción anclado a membrana, (e) fusión RAQ aCD19 / TeV coexpresada con el factor de transcripción anclado a membrana, (f) factor de transcripción GAL4/VP16 constitutivamente activo.

Figura 13(a). Arquitectura generalizada de un RAQ: un dominio de unión reconoce el antígeno; el espaciado eleva el dominio de unión respecto de la superficie celular; el dominio transmembranal ancla la proteína a la membrana y el endodominio transmite señales. (b) a (d): diferentes generaciones y permutaciones de los endodominios RAQ: (B) los diseños iniciales transmitían señales de ITAM solas a través del endodominio FcεR1-γ o Cd3ζ, mientras que diseños posteriores transmitían señales adicionales, una (c) o (d) dos señales coestimuladoras en cis.

Figura 14. Secuencias de proteína ilustrativas que incluyen secuencias de la presente invención.

Figura 15. Bloqueo de la señal de PD-1 utilizando células PBMC de SHP-1 truncada (PTPN6) o SHP-2 truncada, se cotransdujeron con PD1 y RAQ solo (FMC63) o un constructo bicistrónico que contenía RAQ y SHP-1 truncada o RAQ y SHP-2 truncada. Dichas células se cocultivaron durante 48 horas con células SupT1 transducidas con CD19, PDL1 o ambas y se midió la liberación de IFNγ mediante ELISA.

Figura 16. Secuestro de la señal de PD-1 utilizando una fusión de dominios SHP-2 SH2 y Zap70 quinasa. Se cotransdujeron células PBMC con PD1 y RAQ solo (FMC63) o un constructo bicistrónico que contenía RAQ y una proteína de fusión que comprendía dominios SHP-2 SH2 y la ZAP70 quinasa. Dichas células se cocultivaron en una proporción 1:1 durante 24 horas con células SupT1 transducidas con CD19 o PDL1. Se midió la liberación de IFNγ mediante ELISA (A) y la eliminación de las células SupT1 se cuantificó mediante FACS (B).

Descripción detallada

Las rutas de señalización de las células T pueden modularse y alterarse mediante, por ejemplo, los mecanismos indicados en la Tabla 1.

Tabla 1: aplicación de la modulación de señales

<i>Tipo</i>	<i>Mecanismo</i>	<i>Aplicación</i>
Señal de bloqueo	ZAP70, SHP-2 o PTPN6 se truncan - manteniendo el dominio SH2 solo	ZAP70, SHP-2 o PTPN6 truncado compite con ZAP70, SHP-2 o PTPN6 de longitud completa de tipo salvaje. Debido a que lo anterior no señala, se inhibirá la activación. Entre las aplicaciones se incluyen, por ejemplo, con ZAP70 en el caso de que una señal de activación muy fuerte resulte perjudicial, o con PTPN6 o SHP-2 en el caso de que el efecto de una señal inhibitoria, p.ej. PD1/PDL1, necesite reducirse.
Señal cruzada	SH2 de ZAP70 fusionado con PTPN6/SHP-2 fosfatasa, o SH2 de PTPN6/SHP-2 fusionado con ZAP70 quinasa, por ejemplo.	En la presente realización, se fusiona un SH2 de ZAP70 con la fosfatasa de PTPN6/SHP-2, o a la inversa, es decir, el dominio SH2 de PTPN6/SHP-2 se fusiona con el dominio de ZAP70 quinasa. En el caso de que la célula T reciba una señal inhibitoria, la interpreta como una señal de excitación o viceversa.
Señal amplificada	ZAP70 fusionado con dominios ITAM adicionales o PTPN6/SHP-2 fusionado con dominios ITIM adicionales.	Un único fosfo-ITAM o ITIM conduce a una concatenación de dominios ITAM o ITIM que lleva a una señal aumentada o a una sensibilidad incrementada al antígeno.
Señal de derivación	SH2 de ZAP70 o SH2 de PTPN6/SHP-2 fusionado con, p.ej., ectodominios CD28 o 41BB, o dominio de AKT quinasa, un dominio de JAK quinasa, etc.	En la presente realización, puede unirse una señal "no fisiológica" a la ruta de ITAM/ITIM. De esta manera, una señal de ITAM/ITIM puede conducir a una señal coestimuladora, o una señal tal como AKT o una señal de tipo citoquina.
Señal de transcripción	SH2 de ZAP70 o SH2 de PTPN6/SHP-2 fusionado con dominio de proteasa junto con la coexpresión de un factor de transcripción anclado a membrana con un sitio de corte de proteasa liberador.	En la presente realización, se transmite una señal transcripcional con la activación o inhibición del receptor inmunitario. Dicha señal puede resultar, por ejemplo, en la expresión de una citoquina particular tras la activación o inhibición de la célula T.
Señal de castración	El dominio SH2 de ZAP70 o el dominio SH2 de PTPN6/SHP-2 fusionado con un dominio de proteasa; un receptor recíproco presenta un sitio de corte de proteasa.	En la presente realización, la activación o inhibición de un receptor resulta en la inhibición o activación de otro receptor.

PROTEÍNA

La presente exposición proporciona una proteína truncada que comprende un dominio SH2.

La presente exposición proporciona además una proteína de fusión que comprende: (i) un dominio SH2 e (ii) un dominio heterólogo.

El dominio SH2 puede proceder de una proteína que se une a un motivo de activación de inmunorreceptor (ITAM) a base de tirosinas fosforiladas o proceder de una proteína que se une a un motivo de inhibición de inmunorreceptor (ITIM) a base de tirosinas fosforiladas.

Un ejemplo de una proteína que se une a un ITAM es ZAP70. Entre los ejemplos de proteínas que se unen a ITIM se incluyen PTPN6 y SHP-2.

Por lo tanto, la proteína de fusión de la exposición comprende un dominio SH2 y por lo menos un dominio adicional que no se encuentra presente en una proteína de tipo salvaje a partir de la que se deriva el dominio SH2.

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 2 RESPECTO A SRC (SH2)

Las rutas de señalización intracelular resultan iniciadas y controladas por la modificación post-traducciona reversible de las proteínas, incluyendo la fosforilación, la ubiquitinilación y la acetilación.

Los dominios SH2 son dominios de proteína modulares que sirven como adaptadores y median en interacciones proteína-proteína mediante la unión a péptidos fosforilados en sus parejas de unión a proteína respectivas, con frecuencia receptores de superficie celular. Los dominios SH2 típicamente se unen a un residuo de tirosina fosforilada en el contexto de un motivo peptídico más largo dentro de una proteína diana, y los dominios SH2 representan la clase más grande de dominios de reconocimiento de pTyr conocidos. Aunque los dominios SH2 no presentan ninguna actividad catalítica intrínseca, se acoplan frecuentemente con dominios catalíticos independientes y, de esta manera, en respuesta a una señal de entrada específica, sirven para localizar dichos dominios catalíticos en localizaciones subcelulares particulares o en la vecindad de sustratos, activadores o inhibidores apropiados. Además, también pueden encontrarse dominios SH2 unidos a dominios proteicos adaptadores, de manera que pueden servir para la formación de grandes complejos multiproteína.

PROTEÍNA QUINASA 70 ASOCIADA A CADENA ZETA (ZAP70)

ZAP70 es una proteína normalmente expresada en proximidad a la membrana superficial de las células T y las células asesinas naturales. Es parte del receptor de células T (RCT) y desempeña una función crítica en la señalización de las células T. Su peso molecular es de 70 kDa y está compuesto de 2 dominios SH2 N-terminales y un dominio de quinasa C-terminal. Es un miembro de la familia de las proteína-tirosina quinasas.

La primera etapa en la activación de las células T es el reconocimiento de un péptido complejo de CMH sobre la célula diana por parte del RCT. Dicho suceso inicial causa la asociación estrecha de la Lck quinasa y la cola citoplasmática de CD3-zeta en el complejo de RCT. A continuación, Lck fosforila los residuos de tirosina en la cola citoplasmática de CD3-zeta, que permite la captación de ZAP70. ZAP70 es una quinasa que contiene SH2 que desempeña una función crucial en la activación de las células T tras el acoplamiento del RCT. Los dominios SH2 en tándem en ZAP70 se unen a CD3 fosforilado que resulta en que ZAP70 es fosforilado y activado por Lck o por otras moléculas de ZAP70 en trans. A continuación, la ZAP70 activa es capaz de fosforilar corriente abajo las proteínas membranales, clave entre ellos es el conector de proteína de células T activadas (LAT). LAT es una proteína de andamiaje y su fosforilación sobre múltiples residuos permite que interactúe con otras varias proteínas que contienen dominio SH2, incluyendo Grb2, PLC-g y Grap, que reconocen los péptidos fosforilados en LAT y transmiten la señal de activación de las células T corriente abajo, resultando finalmente en un abanico de respuestas de células T. Dicho procedimiento se resume en la figura 1.

La proteína ZAP70 humana presenta el número de acceso de UniProtKB P43403. Dicha secuencia presenta 619 aminoácidos de longitud y se muestra en la SEC ID nº 1.

Secuencia de aminoácidos de ZAP70 (SEC ID nº 1)

```
MPDPAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYA
IAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRP SGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQ
AIISQAPQVEKLIATTATHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTYSLSIYGKTVYH
YLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPHPSTLTHP
QRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDEELKDKKFLKRDNLLIADIELGCGNFG
SVRQGVYRMKKQIDVAIKVLKQTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGG
PLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADD
SYYTARSAGKWPLKWAPECFINFRKFSSRSVWSYGVMTWEALSYGQKPYKKMKGPVMAFIEQGKRMEC
PPECPELYALMSDCWIYKWEDRPDLTVEQRMACYYSLSASKVEGPPGSTQKAEAAACA
```

La proteína de fusión de la exposición puede comprender un dominio SH2 de ZAP70. La proteína truncada de la exposición puede comprender o consistir en un dominio SH2 de ZAP70. A este respecto, la fusión o proteína truncada puede comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEC ID nº 2.

Dominio SH2 completo de ZAP70 (SEC ID nº 2)

```
MPDPAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYA
IAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRP SGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQ
AIISQAPQVEKLIATTATHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTYSLSIYGKTVYH
YLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPHPSTLTHP
```

ZAP70 presenta dos dominios SH2 en el extremo N-terminal de la secuencia, en los residuos 10-102 y 163-254 de la secuencia mostrada en SEC ID nº 1. La proteína truncada o la proteína de fusión de la invención puede comprender, por lo tanto, una o ambas secuencias mostradas en SEC ID nº 3 y nº 4.

SH2 1 de ZAP70 (SEC ID nº 3)

FFYGSISRAEAEHKLKLAGMADGLFLLRQCLRSLGGYVLSLVHVDVRFHHFPIERQLNGTYAIAGGKAHCG
PAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPC

5 SH2 2 de ZAP70 (SEC ID nº 4)

WYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTIALSLIYGKTVYHYLISQDKAGKYCIPEGTKFDL
WQLVEYLKADGLIYCLKEAC

10 La proteína de fusión puede comprender una variante de SEC ID nº 2, nº 3 o nº 4 con una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, con la condición de que la secuencia variante es una secuencia de dominio SH2 presenta las propiedades requeridas. En otras palabras, la secuencia variante debería ser capaz de unirse a los residuos de tirosina fosforilados en la cola citoplasmática de Cd3-zeta que permite la captación de ZAP70.

15 Los métodos de alineación de secuencias son bien conocidos de la técnica y se llevan a cabo utilizando programas de alineación adecuados. El % de identidad de secuencia se refiere al porcentaje de residuos aminoácidos o nucleótidos que son idénticos en las dos secuencias una vez se han alineado óptimamente. La homología o identidad de secuencias de nucleótidos y de proteínas pueden determinarse utilizando algoritmos estándares, tales como un programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool en el National Center for Biotechnology Information) utilizando parámetros por defecto, que se encuentra disponible públicamente en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Entre otros algoritmos para determinar la identidad u homología de secuencias se incluyen: LALIGN (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/> and <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/nucleotide.html>), AMAS (análisis de secuencias múltiplemente alineadas, en: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/Software/Amas/amas.html>), FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>), Clustal Omega

25 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), SIM (<http://web.expasy.org/sim/>) y EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html).

30 La proteína de fusión puede comprender el dominio SH2 de ZAP70 y el dominio de quinasa de ZAP70. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 1 o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

PROTEÍNA-TIROSINA FOSFATASA NO RECEPTORA TIPO 6 (PTPN6)

35 PTPN6 también es conocida como fosfatasa-1 que contiene la región 2 del dominio de homología de Src (SHP-1). Es un miembro de la familia de las proteína-tirosina fosfatasas.

La región N-terminal de PTPN6 contiene dos dominios SH2 en tándem que median en la interacción de PTPN6 y sus sustratos. La región C-terminal contiene un dominio de proteína-tirosina fosfatasa.

40 PTPN6 es capaz de unirse y propagar señales de varios receptores inmunitarios inhibitorios o receptores que contienen ITIM. Entre los ejemplos de dichos receptores se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, PD1, PDCD1, BTLA4, LILRB1, LAIR1, CTLA4, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL1 y KIR3DL3.

45 La proteína PTPN6 humana presenta el número de acceso de UniProtKB P29350. Dicha secuencia presenta 595 aminoácidos de longitud y se muestra en la SEC ID nº 5.

Secuencia de aminoácidos de PTPN6 (SEC ID nº 5)

MVRWFHRDL SGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGD FSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFA
TLTELVEYYTQQQGVLDQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVRESLS
QPGDFVLSVLSLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETDFSLDLDVEHFKKTGIEEASGAFFVYLR
QPYATRVNAADIENRVLELNKKQES EDTAKAGFWEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGNKRYKNIL
PFDHSRVILQGRDSNIPGSDYINANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDWFQMAWQENS RVIVMT
TREVEKGRNKCVPYWPVEVGMQRAYGPYSVTNCGEHD TTEYKLRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDH
GVPSEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQKTIQM
VRAQRSGMVQTEAQYKFIYVAIAQFIETTKKKLEVLQSQKQSEYGNITYPPAMKNAHAKASRTSSKHK
EDVYENLHTKNKREEKVKKQRSADKEKSKGSLKRR

50 La proteína truncada de la invención puede comprender o consistir en un dominio SH2 de PTPN6. A este respecto, la proteína truncada puede comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEC ID nº 6.

Dominio completo SH2 de PTPN6 (SEC ID nº 6)

MVRWFHRDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFA
 TLTELVEYYTQQQGVQLQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLVRESLS
 QPGDFVLSVLSLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETDFSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLR
 QPYY

- 5 PTPN6 presenta dos dominios SH2 en el extremo N-terminal de la secuencia, en los residuos 4-100 y 110-213 de la secuencia mostrada en SEC ID nº 5. La proteína truncada de la invención puede comprender, por lo tanto, una o ambas secuencias mostradas en SEC ID nº 3 y nº 4.

SH2 1 de PTPN6 (SEC ID nº 7)

10 W FHRDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFATLT
 ELVEYYTQQQGVQLQDRDGTIIHLKYPL

SH2 2 de PTPN6 (SEC ID nº 8)

15 WYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLVRESLSQPGDFVLSVLSLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVG
 GLETDFSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPY

- 20 La proteína puede comprender una variante de SEC ID nº 6, nº 7 o nº 8 con una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, con la condición de que la secuencia variante es una secuencia de dominio SH2 presenta las propiedades requeridas. En otras palabras, la secuencia variante debería ser capaz de unión a los residuos de tirosina fosforilada en la cola citoplasmática de por lo menos de PD1, PDCD1, BTLA4, LILRB1, LAIR1, CTLA4, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL1 o KIR3DL3 que permite la captación de PTPN6.

- 25 En determinadas realizaciones, la proteína puede comprender el dominio SH2 de PTPN6 y el dominio de fosfatasa de PTPN6. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 5 o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

SHP-2

- 30 SHP-2, también conocido como PTPN11, PTP-1D y PTP-2C es un miembro de la familia de la proteína tirosina fosfatasa (PTP). Al igual que PTPN6, SHP-2 presenta una estructura de dominio que consiste en dos dominios SH2 en tándem en su extremo N-terminal seguido de un dominio de proteína tirosina fosfatasa (PTP). En el estado inactivo, el dominio SH2 N-terminal se une al dominio PTP y bloquea el acceso de los potenciales sustratos al sitio activo. De esta manera, SHP-2 se encuentra autoinhibida. Tras la unión a los residuos fosfotirosilo diana, el dominio SH2 N-terminal se libera del dominio PTP, activando catalíticamente el enzima mediante liberación de la autoinhibición.

- 35 La SHP-2 humana presenta el número de acceso de UniProtKB P35235-1. Dicha secuencia presenta 597 aminoácidos de longitud y se muestra en la SEC ID nº 9.

Secuencia de aminoácidos de SHP-2 (SEC ID nº 9)

40 MTSRRWFHPNITGVEAENLLLTRGVDGSFLARPSKSNPGDFTLSVRRNGAVTHIKIQNTGDYYDLYGGEK
 FATLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIELKYPLNCADPTSERWFHGLSGKEAEKLLTEKGKHSFLVRES
 QSHPGDFVLSVRTGDDKGESNDGKSKVTHVMIRCQELKYDVGGERFDSLTDLVEHYKKNPMVETLGTVL
 QLKQPLNTRINAAEIESRVRELSKLAETTDKVKQGFWEFETLQQQECKLLYSRKEGQRQENKNKNRYK
 NILPFDHTRVVLHDGDPNEPVSDYINANIIMPEFETKCNNSKPKKSYIATQGCLQNTVNDFWRMVFEENS
 RVIVMTTKEVERGKSKCVKYWPDEYALKEYGVMVRNVKESAAHDYTLRELKLSKVGQALLQGNTERTVW
 QYHFRTWPDHGVPSDPGGVLDLFLEEVHHKQESIVDAGPVVVHCSAGIGRTGTFFIVIDILIDIIREKGVDC
 DIDVPKTIQMVRSGRSGMVQTEAQYRFIYMAVQHYIETLQRRIEEQKSKRKGHEYTNIKYSLVDQTSGD
 QSPLPPTCTPTPCAEMREDSARVYENVGLMQQQRSGR

- 45 La proteína truncada de la invención puede comprender o consistir en un dominio SH2 de SHP-2. A este respecto, la proteína truncada puede comprender o consistir en el primer dominio SH2 de SHP-2, comprendiendo por ejemplo los aminoácidos 6 a 102 de SEC ID nº 9 o el segundo dominio SH2 de SHP-2, comprendiendo por ejemplo los aminoácidos 112 a 216 de SHP-2. La proteína truncada puede comprender o consistir en la secuencia mostrada en SEC ID nº 10, 11 o 12.

Primer dominio SH2 de SHP-2 (SEC ID nº 10)

WFHPNITGVEAENLLLTRGVDGSFLARPSKSNPGDFTLSVRRNGAVTHIKIQNTGDYYDLYGGEKFATLA
ELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIELKYPL

5 Segundo dominio SH2 de SHP-2 (SEC ID nº 11)

WFHGHLSGKEAEKLLTEKGKHSFLVRESQSHPGDFVLSVRTGDDKGESNDGKSKVTHVMIRCQELKYDV
GGGERFDSLTDLVEHYKKNPMVETLGTVLQLKQPL

Ambos dominios SH2 de SHP-2 (SEC ID nº 12)

10 WFHPNITGVEAENLLLTRGVDGSFLARPSKSNPGDFTLSVRRNGAVTHIKIQNTGDYYDLYGGEKFATLA
ELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIELKYPLNCADPTSERWFHGHLSGKEAEKLLTEKGKHSFLVRESQSHPG
DFVLSVRTGDDKGESNDGKSKVTHVMIRCQELKYDVGGGERFDSLTDLVEHYKKNPMVETLGTVLQLKQP
L

15 La proteína puede comprender una variante de SEC ID nº 10, nº 11 o nº 12 con una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, con la condición de que la secuencia variante sea una secuencia de dominio SH2 capaz de unión a un dominio que contiene ITIM. Por ejemplo, la secuencia variante puede ser capaz de unión a los residuos de tirosina fosforilada en la cola citoplasmática de PD1, PDCD1, BTLA4, LILRB1, LAIR1, CTLA4, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL1 o KIR3DL3.

DOMINIO HETERÓLOGO

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “dominio heterólogo” se refiere a cualquier dominio de proteína que no se encuentra presente en:

- 25 i) ZAP70 de tipo salvaje (ver la SEC ID nº 1) para proteínas de fusión que comprenden un dominio SH2 de ZAP70,
ii) PTPN6 de tipo salvaje (ver la SEC ID nº 5) para proteínas de fusión que comprenden un dominio SH2 de PTPN6,
o
iii) SHP-2 de tipo salvaje (ver la SEC ID nº 9) para proteínas de fusión que comprenden un dominio SH2 de SHP-2.

30 El dominio heterólogo puede ser, o puede ser derivable de (p.ej., puede ser parte de) una proteína diferente de ZAP70, SHP-2 o PTPN6.

Alternativamente, la proteína de fusión puede comprender una fusión de dominio SH2 de ZAP70 y un dominio de PTPN6, tal como el dominio de PTPN6 quinasa. Del mismo modo, la proteína de fusión puede comprender una fusión de dominio SH2 de PTPN6 y un dominio de ZAP70, tal como el dominio de ZAP70 quinasa.

SEÑAL AMPLIFICADA

La presente exposición proporciona una proteína de fusión que comprende: un dominio SH2 de una proteína de unión a ITAM y un dominio que contiene ITAM.

La presente exposición proporciona además una proteína de fusión que comprende: un dominio SH2 de una proteína de unión a ITIM y un dominio que contiene ITIM.

Estas moléculas de señalización “amplificadas” amplificarán una señal de excitación o inhibitoria dentro de una célula inmunitaria, tal como una célula T.

Tal como se muestra en la figura 4, la presencia de dichas moléculas conducirá a una concatenación de ITAM o ITM que conduce a una señal activadora o inhibidora aumentada, respectivamente.

La amplificación de una señal activadora resulta útil en situaciones en las que resulta deseable incrementar la sensibilidad de la célula inmunitaria (tal como una célula T-RAQ) al antígeno. Lo anterior puede ser el caso cuando, por ejemplo, el antígeno diana se expresa a niveles bajos sobre las células diana.

La amplificación de un sistema inhibitor en situaciones en las que resulta deseable reducir o evitar la activación de las células T. El documento nº WO2015/075469 describe un panel de pares de receptores de antígeno quimérico de “puerta lógica” que, al ser expresado por una célula, tal como una célula T, es capaz de detectar un patrón particular de la expresión de por lo menos dos antígenos diana A y B. La “puerta Y/NO” descrita en la presente solicitud

comprende una pareja de RAQ, de manera que la célula T se induce únicamente en el caso de que se encuentre presente el antígeno A pero no el antígeno B sobre la célula diana. En dicha puerta Y/NO, un RAQ (que reconoce el antígeno A) presenta un endodominio activador que comprende un ITAM, mientras que el otro RAQ (que reconoce el antígeno B) presenta un endodominio inhibidor que puede comprender un ITIM. En presencia del antígeno A solo, la presencia de RAQ inhibidora no ligada resulta insuficiente para evitar la activación de las células T, de manera que se produce la activación. Sin embargo, en presencia de ambos antígenos, se forman zonas de membrana con concentraciones elevadas de RAQ tanto activadores como inhibidores. Debido a que ambos endodominios se encuentran concentrados, se bloquea o se reduce la activación de las células T.

La amplificación de la señal inhibidora utilizando una molécula de señalización amplificada de la presente invención podría utilizarse en una puerta Y para reducir o eliminar cualquier señalización residual que se produce en presencia de ambos antígenos, es decir, por la inhibición incompleta del RAQ activador por el RAQ inhibidor.

DOMINIO QUE CONTIENE ITAM

La proteína de fusión puede comprender un dominio SH2 de ZAP70 y un dominio que contiene dominio de activación de inmunorreceptor a base de tirosinas (ITAM).

Una fusión de ZAP70 de longitud completa con un dominio que contiene ITAM resulta en una estructura que amplifica una señal inmunitaria activadora. En la presente memoria, la proteína de fusión se capta en un endodominio de inmunorreceptor fosfo-ITAM. ZAP70 funciona normalmente propagando la señal, aunque además proporciona otro juego de ITAM que resultan fosforilados y captan más ZAP70. Lo anterior puede resultar útil para incrementar la fuerza de la señal y puede incrementar la sensibilidad a antígenos a baja densidad, por ejemplo. La fusión puede incluir solo el dominio SH2 de ZAP70 con un endodominio que contiene ITAM (p.ej., la fusión no contiene un dominio de ZAP70 quinasa). La proporción de dominios catalíticos de ZAP70 (dominios de quinasa) con ITAM puede modificarse para afectar a la cinética de activación en respuesta a la dinámica de las interacciones de receptor activadoras con una diana afín.

Un ITAM es una secuencia conservada de cuatro aminoácidos que se repite dos veces en las colas citoplasmáticas de determinadas proteínas de superficie celular del sistema inmunitario. El motivo contiene una tirosina separada de una leucina o isoleucina por cualesquiera dos otros aminoácidos, proporcionando la firma YxxL/I. Dos de dichas firmas están típicamente separadas por 6 a 8 aminoácidos en la cola de la molécula (YxxL/Ix(6-8)YxxL/I).

Los ITAM resultan importantes para la transducción de señales en las células inmunitarias. Por lo tanto, se encuentran en las colas de importantes moléculas de señalización celular, tales como las cadenas CD3 y ζ del complejo de receptores de células T, las cadenas alfa y beta de CD79 del complejo de receptores de células B, y determinados receptores de Fc. Los residuos de tirosina dentro de dichos motivos resultan fosforilados tras la interacción de las moléculas de receptor con sus ligandos y forman sitios de acoplamiento para otras proteínas que participan en las rutas de señalización de la célula.

Es conocido que varias proteínas contienen endodominios con uno o más motivos ITAM. Entre los ejemplos de dichas proteínas se incluyen la cadena epsilon de CD3, la cadena gamma de CD3 y la cadena delta de CD3, entre otras. El motivo ITAM puede reconocerse fácilmente como una tirosina separada de una leucina o isoleucina por cualesquiera otros dos aminoácidos, proporcionando la firma YxxL/I. Típicamente, aunque no siempre, dos de dichos motivos están separados por 6 a 8 aminoácidos en la cola de la molécula (YxxL/Ix(6-8)YxxL/I). Por lo tanto, el experto en la materia puede encontrar fácilmente proteínas existentes que contienen uno o más ITAM para transmitir una señal de activación. Además, dado que el motivo es simple y no resulta necesaria una estructura secundaria compleja, el experto en la materia puede diseñar polipéptidos que contienen ITAM artificiales para transmitir una señal de activación (ver el documento nº WO 2000/063372, que se refiere a moléculas de señalización sintéticas).

El dominio que contiene ITAM puede ser o comprender un endodominio CD3-zeta. Convenientemente, el dominio que contiene ITAM puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 13 o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% que conserva la capacidad de resultar fosforilada y captar ZAP70.

SEC ID nº 13 (endodominio CD3-zeta)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

A título de ejemplo, la proteína de fusión puede ser o puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 14, que contiene un dominio ZAP70-SH2 fusionado con un endodominio CD3-zeta.

SEC ID nº 14

MRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGMPDPA
AHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLLGGYVLSLVHDVRFHHFP IERQLNGTYAIAGGK
AHCSPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRP SGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQ
APQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGDKFLLRPRKEQGTAYSLIYGKTVYHYLISQ
DKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPSTLTHPQRRID
TLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPDTSVYESPYSDPEELKDKKFLKRDNLIIADIELGCGNFGSVRQG
VYMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAIHQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKF
LVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTA
RSAGKWPLKWAYPECINFRKFSSRSVWSYGVMTWEALSYGQKPYKKMGPEVMAFIEQGKRMECPPECP
PELYALMSDCWIYKWEDRPDLTVEQMRACYSLASKVEGPPGSTQKAEAAACA

- 5 Convenientemente, la proteína de fusión puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 14 o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

DOMINIO QUE CONTIENE ITIM

- 10 La proteína de fusión puede comprender un dominio SH2 de PTPN6 y un dominio que contiene dominio de inhibición de inmunorreceptor a base de tirosinas (ITIM).

- 15 Una fusión de PTPN6 de longitud completa con un dominio que contiene ITIM resulta en una estructura que amplifica una señal inmunitaria inhibidora. En la presente memoria, la proteína de fusión se capta en un endodominio de inmunorreceptor fosfo-ITIM. PTPN6 funciona normalmente propagando la señal, aunque además proporciona otro juego de ITIM que resultan fosforilados y captan más PTPN6. La fusión puede incluir solo el dominio SH2 de PTPN6 con un endodominio que contiene ITIM (p.ej., la fusión no contiene un dominio de PTPN6 fosfatasa). La proporción de dominios catalíticos de PTPN6 (dominios de fosfatasa) con ITIM puede modificarse para afectar a la cinética de activación en respuesta a la dinámica de las interacciones de receptor inhibidoras con una diana afín.

- 20 Un ITIM es una secuencia conservada de aminoácidos (S/I/V/LxYxxI/V/L) que se encuentra en las colas citoplasmáticas de muchos receptores inhibitorios del sistema inmunitario. Tras la interacción de receptores inhibitorios que poseen ITIM con su ligando, su motivo ITIM resulta fosforilado por enzimas de las Src quinasas, permitiendo que capten PTPN6 mediante interacciones entre el dominio SH2 de PTPN6 y los dominios ITIM fosforilados.

- 25 Entre los endodominios que contienen ITIM se incluyen los de CD22, LAIR-1, la familia de receptores inhibitorios asesinos (KIR), LILRB1, CTLA4, PD-1, BTLA, por ejemplo.

- 30 Los endodominios ITIM de PDCD1, BTLA4, LILRB1, LAIR1, CTLA4, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL1 y KIR3DL3 se muestran en SEC ID nº 15 a 24, respectivamente.

SEC ID nº 15: endodominio PDCD1

CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATI
VFPSSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

SEC ID nº 16: BTLA4

KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGP HSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPENIPRTG
DAESSEMQRPPPDCCDDTVTYSALHQRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELI
QFGVGERPQAQENVYVILKH

SEC ID nº 17: LILRB1

- 35 LRHRRQGKHWSTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSP
HDEDPAQVITYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVITYAQLHSLTL
RREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH

SEC ID nº 18: LAIR1

HRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQQRPDLAVDVLERTADKATVNGLPKDRDTDSALAAGSSQEVITYAQLDH
WALTQRTARAVSPQSTKPMASITYAAVARH

SEC ID nº 19: CTLA4

FLWLILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN

SEC ID nº 20: KIR2DL1

GNSRHLHVLIGTSVVIIPFAILLFFLLHRWCANKKNAVVMQEPAGNRTVNREDSDEQDPQEVITYQLNH
CVFTQQRKITRPSQRPKTPPTDIIIVYTELPNAESRSKVVSCP

SEC ID nº 21: KIR2DL4

GIARHLHAVIRYSVAIILFTILFFLLHRWCSKKKNAAVMNQEPAGHRTVNREDSDEQDPQEVITYAQLD
HCIFTQQRKITGPSQRSKRPSTDTSVCIELPNAEPALSPAHEHHSQALMGSSRETTALSQTQLASSNVPA
AGI

SEC ID nº 22: KIR2DL5

TGIRRHHLILIGTSVAIILFIILFFLLHCCSNKKNAAVMDQEPAGDRTVNREDSDDQDPQEVITYAQLD
HCVFTQTKITSPSQRPKTPPTDTTMYMELPNAKPRSLSPAHHHSQALRGSSRETTALSQNRVASSHVPA
AGI

SEC ID nº 23: KIR3DL1

KDPRHLHILIGTSVVIILFILLFFLLHLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPQEVITYAQLDH
CVFTQQRKITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP

SEC ID nº 24: KIR3DL3

KDPGNSRHLHVLIGTSVVIIPFAILLFFLLHRWCANKKNAVVMQEPAGNRTVNREDSDEQDPQEVITYAQ
LNHCFTQQRKITRPSQRPKTPPTDTSV

- 5 El dominio que contiene ITIM puede ser o puede comprender un endodominio PDCD1, BTLA4, LILRB1, LAIR1, CTLA4, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL1 o KIR3DL3. Convenientemente, el dominio que contiene ITIM puede comprender la secuencia mostrada en cualquiera de las SEC ID nº 15 a 24 o una variante de las mismas con una identidad de secuencias de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% que conserva la capacidad de resultar fosforiladas por Src quinasas y amplificar una señal inmunitaria inhibitoria.
- 10 A título de ejemplo, la proteína de fusión puede ser o puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 25, que contiene un dominio PTPN6-SH2 fusionado con un endodominio PD1.

SEC ID nº 25

MTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRS
AQPLRPEDGHCSWPLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMVRWFHRDLGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRK
NQGDFFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFATLTLEVEYYTQQQGVLDQRDGTIIHLKYPLNCSD
PTSERWYHGHMSGGAETLLQAKGEPWTFVLVRESLSQPGDFVLSVLSQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGG
RYTVGGLETFTDSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYATRVNAADIENRVLELNKKQES EDTAKAGF
WEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGNRYKNI LPFDHSRVILQGRDSNIPGSDYINANYIKNQLLGP
DENAKTYIASQGCLEATVNDWFQMAWQENSRIVMTTREV EKGKRNKCVPYWPEVGMQRAYGPYSVTNCGE
HDTTEYKLRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDHGVPSPPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCS
AGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQKTIQMVRARSGMVQTEAQYKFIYVAIAQFIETTKKKLE
VLQSQKGQSEYGNITYPPAMKNAHAKASRTSSKHKEDVYENLHTKNKREEKVKKQRSADKEKSKGSLKR
K

- 15 Convenientemente, la proteína de fusión puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 25 o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

SEÑAL CRUZADA

- 20 La presente exposición proporciona una proteína de fusión que comprende: un dominio SH2 de una proteína de unión a ITAM y un dominio de fosfatasa.

La presente exposición proporciona además una proteína de fusión que comprende: un dominio SH2 de una proteína de unión a ITIM y un dominio de quinasa.

Estas moléculas de señalización “amplificadas” amplificarán una señal de excitación o inhibitoria dentro de una célula inmunitaria, tal como una célula T. Al recibir una célula T una señal de excitación, por ejemplo, tras el reconocimiento de un antígeno diana por un RAQ, o péptido de CMH por un RCT, la presencia del primer tipo de molécula cruzada resultará en que la célula interpretará la señal de excitación como una señal inhibitoria.

La amortiguación o revisación de la activación de las células T puede resultar útil en una diversidad de situaciones, por ejemplo puede utilizarse para células T expresantes de RAQ en las que hay un nivel elevado de expresión del antígeno diana sobre la célula diana. Puede utilizarse para evitar la sobreactivación de las células T que puede conducir al agotamiento de las células T y/o a la muerte celular inducida por activación. La prevención de que una célula resulta activada excesivamente o con excesiva rapidez también puede evitar o reducir los efectos secundarios patológicos del tratamiento de RAQ-células T, tal como el síndrome de liberación de citoquinas (SLC).

La situación inversa es que una célula T reciba una señal inhibitoria, por ejemplo, tras la ligación de PD1 y la presencia del segundo tipo de molécula cruzada resulta en que la célula interpreta la señal inhibitoria como una señal de excitación.

La reducción o reversión de la inhibición de las células T ayudará a la célula a superar los estímulos inhibitorios dentro del microambiente tumoral hostil y, por lo tanto, deberían incrementar la persistencia y expansión in vivo de las células T.

La proteína de fusión puede comprender un dominio SH2 de PTPN6 y un dominio de quinasa de ZAP70. La presente proteína de fusión puede comprender un dominio SH2 de ZAP70 fusionado con un dominio de PTPN6 quinasa.

En el caso de que la proteína comprenda un dominio SH2 de ZAP70 fusionado con el dominio de fosfatasa de PTPN6, en el caso de que la célula T reciba una señal de excitación, la interpreta como una señal inhibitoria debido a que el dominio de PTPN6 fosfatasa resulta captado en el ITAM activado mediante el dominio SH2 de ZAP70.

En el caso de que la proteína comprenda un dominio SH2 de PTPN6 fusionado con el dominio de quinasa de ZAP70, en el caso de que la célula T reciba una señal inhibitoria, la interpreta como una señal de excitación debido a que el dominio de ZAP70 quinasa resulta captado en el ITIM activado mediante el dominio de PTPN6. Una fusión entre el dominio SH2 de PTPN6 y dominio de ZAP70 quinasa resultará en la competición para ITIM fosforilados con PTPN6 de tipo salvaje, bloqueando las señales inhibitorias, aunque además transmitirá una señal de activación paradójica. Lo anterior puede presentar una aplicación en la superación de las señales de bloqueo del punto de control en un microambiente tumoral.

Las secuencias de los dominios humanos de ZAP70 quinasa, PTPN6 fosfatasa y SHP-2 fosfatasa se muestran en SEC ID nº 26, nº 27 y nº 28, respectivamente.

SEC ID nº 26 - dominio quinasa de ZAP70

DPEELKDKKFLKRDNLIIADIELGCGNFGSVRQGVYMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQIM
HQLDNFYIVRLIGVCQAEALMLVMEAGGGPLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHR
DLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSSYTTARSAGKWLKWAPEKINFRKFSRSDVWSYGVTMW
EALS YGQKPKYKMMKGPVMAFIEQGRMECPPECPPELYALMSDCWIKWEDRPDLTVEQRMRAQYYSL
ASKVEGPPGSTQKAEACA

SEC ID nº 27 - dominio fosfatasa de PTPN6

FWEEFESLQKQEVKNLHQRLLEGQRPENKGNRYKNILPFDHSRVILQGRDSNIPGSDYINANYIKNQLLG
PDENAKTYIASQGCLEATVNDWFQMAWQENSRVIVMTTREVEKGRNKCVPYWPVEVGMQRAYGPFYSVTNCG
EHDTEYKLRITLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDHGVSEPFGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHC
SAGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQKTIQMVRAQRSGMVQTEAQYKFIYVAIAQFIETTKKKL

SEC ID nº 28 - dominio fosfatasa de SHP-2

WEEFETLQQQECKLLYSRKEGQRQENKKNRYKNILPFDHTRVVLHDGDPNEPVSDYINANII
MPEFETKCNNSKPKKSYIATQGCQNITVNDFWRMVFQENSRVIVMTTKEVERGKSKCVKYWPDEYALKE
YGVMRVRNVKESAADHYTLRELKLSKVGQALLQGNTERTVWQYHFRTWPDHGVSPDPGGVLDLFEEVH
HKQESIMDAGPVVVHCSAGIGRTGTIFIVIDILDIHREKGVDCDIDVPKTIQMVRSQRSGMVQTEAQYRFIYM

El dominio de ZAP70 quinasa, el dominio de PTPN6 fosfatasa o el dominio de SHP-2 fosfatasa pueden ser o pueden comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 26, SEC ID nº 27 o SEC ID nº 28, respectivamente, o una variante de las mismas que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% que conserva la capacidad de fosforilar o defosforilar proteínas corriente abajo de la misma manera que los dominios de quinasa/fosfatasa de tipo salvaje.

Se muestran ejemplos de proteína de fusión que comprende un dominio SH2 de PTPN6 fusionado con un dominio quinasa de ZAP70, un dominio SH2 de ZAP70 fusionado con un dominio quinasa de PTPN6, y un dominio SH2 de SHP-2 fusionado con un dominio quinasa de ZAP70 en SEC ID nº 29, SEC ID nº 30 y SEC ID nº 61, respectivamente.

5

SEC ID nº 29 - fusión de dominio SH2 de PTPN6:dominio quinasa de ZAP70

MVRWFHRDLGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGGDFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFA
TLTELVEYYTQQQGVLDQDRDGTIIHLKYLNCSDPTSERWYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLVRESLS
QPGDFVLSVLSLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETDFSLDVEHFKKTGIEEASGAFVYLR
QPYYSGGGSDPEELKDKKFLKRDNLLIADIELGCGNFGSVRQGVYMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADT
EEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMK
YLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKWPLKWAPECINFRKFSRS
DVWSYGVMTWEALSYGQKPYKKMKGPVMAFIEQGKRMECPPECPELYALMSDCWIYKWEDRPDLTVE
QRMRACYSLASKVEGPPGSTQKAEACA

SEC ID nº 30 - fusión de dominio SH2 de ZAP70:dominio fosfatasa de PTPN6

MPDPAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLGGYVLSLVHDVRFHFFIERQLNGTYA
IAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTKLEGEALEQ
AIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTALSLIYKTVYH
YLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPSTLTHP
SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSFWEFESLQKQEVKNLHQRLGQRPENKGNRYKNILPFDHSRVLQGR
DSNIPGSDYINANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRIVMTTREVKEGRNKCV
PYWPEVGMQRAYGPYSVTNCGEHTTEYKLRITLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDHGVPSPPGGVLSF

LDQINQRQESLPHAGPIIWHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQKTIQMVRAQRSGMVQTE
AQYKFIYVAIAQFIETTKKL

SEC ID nº 61 - dominios SH2 duales de SHP-2 fusionados con dominio quinasa de ZAP70

WFHPNITGVEAENLLLRGVDGSFLARPSKSNPGDFTLSVRNGAVTHIKIQNTGDDYDLYGGEKFA
ELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIELKYPLNCADPTSERWFHGLSGKEAEKLLTEKGKHSFLVRESQSHPG
DFVLSVRTGDDKGSNDGKSKVTHVMIRQCQELKYDVGGERFDSLTDLVEHYKKNPMVETLTGTVLQLKQP
LNTTRINPNSASNASGAAAPTLPAPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYES
PYSPEELKDKKFLKRDNLLIADIELGCGNFGSVRQGVYMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREA
QIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNF
VHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKWPLKWAPECINFRKFSRSDVWSYGV
TMWEALSYGQKPYKKMKGPVMAFIEQGKRMECPPECPELYALMSDCWIYKWEDRPDLTVEQRMRA
CYSL

La proteína de fusión puede ser o puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 29, SEC ID nº 30 o SEC ID nº 61 o una variante de las mismas que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

10

DOMINIO DE SEÑALIZACIÓN HETERÓLOGO

La presente proteína de fusión puede comprender (i) un dominio SH2 de ZAP70, PTPN6 o SHP-2 e (ii) un dominio de señalización heterólogo.

15

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio de señalización heterólogo" se refiere a un dominio de señalización que no se encuentra presente en la proteína ZAP70, PTPN6 o SHP-2 de tipo salvaje. De esta manera, en donde la proteína de fusión comprende un dominio SH2 de ZAP70, comprende un dominio de señalización que no es el dominio de ZAP70 quinasa. Alternativamente, en el caso de que la proteína de fusión comprende un dominio SH2 de PTPN6, comprende un dominio de señalización que no es el dominio de PTPN6 fosfatasa.

20

SEÑAL DE DERIVACIÓN

El dominio de señalización heterólogo puede ser de una molécula de señalización que no se activa habitualmente con un receptor que contiene ITAM. En otras palabras, el dominio de señalización heterólogo puede ser de una molécula de señalización que no participa en la propagación de la señal inmunitaria nº 1 tras la unión del antígeno al RCT. La señal inmunitaria nº 1 resulta suficiente para inducir la eliminación de las células T de células diana afines, pero no activa por completo las células T para la proliferación y supervivencia.

25

30

La presente exposición proporciona una proteína de fusión que comprende: (i) un dominio SH2 de una proteína que se une a un ITAM, y (ii) un dominio de señalización heterólogo.

Una fusión entre, por ejemplo, ZAP70 y otra molécula de señalización no típicamente activada con un receptor que

contiene ITAM puede actuar derivando la señal de una ruta a otra. Un ejemplo es la coestimulación. Una fusión entre ZAP70 y el endodominio de CD28 puede transmitir una señal coestimuladora de CD28, así como una señal activadora de ITAM. De manera similar, una fusión entre ZAP70 y el endodominio 41BB o OX40 puede transmitir una señal coestimuladora de 41BB o OX40. También pueden captarse otras rutas, por ejemplo, una fusión entre ZAP70 y el dominio de AKT quinasa puede resultar en la transmisión de una señal de AKT al fosforilarse ITAM. Entre otros ejemplos puede incluirse el dominio de quinasa de JAK. De esta manera, una célula T puede interpretar una señal simple de reconocimiento de antígeno como transmisora de una señal coestimuladora e incluso de tipo citoquina.

Dichas proteínas de fusión pueden resultar útiles en, por ejemplo, enfoques en los que las estimulaciones ex vivo repetidas de células T pueden resultar en poblaciones que no presentan antígenos de superficie coestimuladores y que presentan una capacidad proliferativa limitada in vivo, dando como resultado una persistencia y eficacia limitadas. La pérdida de antígenos de superficie coestimuladores que conducen a la activación de las células T únicamente a través del RCT se ha asociado a un mayor grado de muerte celular inducida por activación que impactaría negativamente sobre la eficacia y persistencia in vivo. El efecto puede revertirse mediante la activación de 4-1BB y OX40 expresados en superficie, que demuestra que coestimulación puede evitar la muerte celular inducida por activación y puede permitir una mayor expansión de las células T específicas tumorales.

La presente exposición proporciona una proteína de fusión que comprende: (i) un dominio SH2 de una proteína que se une a un ITIM, y (ii) un dominio de señalización heterólogo.

Por ejemplo, puede fusionarse un dominio SH2 de PTPN6 o un dominio SH2 de SHP-2 con un endodominio coestimulador de manera que una célula T interpreta una señal inhibitoria como una coestimuladora.

El dominio de señalización heterólogo puede proceder de, por ejemplo, CD28, 41BB o OX40.

CD28 proporciona una potente señal coestimuladora - es decir, una señal inmunitaria 2 que induce la proliferación de las células T. CD28 es el receptor para las proteínas CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2).

41BB (CD137) es una glucoproteína transmembranal de tipo 2 perteneciente a la superfamilia de TNF, expresada sobre las células T activadas. El entrecruzamiento de 41BB potencia la proliferación de las células T, la secreción de IL-2, la supervivencia y la actividad citolítica.

OX40 (CD134) es una molécula coestimuladora secundaria, que se expresa 24 a 72 horas después de la activación; su ligando, OX40L, tampoco se expresa sobre las células presentadoras de antígeno en reposo, aunque sí se expresa después de su activación. La expresión de OX40 es dependiente de la activación total de la célula T; sin CD28, se retrasa la expresión de OX40 y los niveles son cuatro veces inferiores. La señalización a través de OX40 resulta necesaria para la supervivencia prolongada de las células T después de la activación y proliferación iniciales.

Los dominios de señalización de CD28, 41BB y OX40 (endodominios) se muestran como SEC ID nº 31, nº 32 y nº 33, respectivamente.

SEC ID nº 31 - endodominio de CD28
MRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

SEC ID nº 32 - endodominio de 41BB
MKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

SEC ID nº 33 - endodominio de OX40
MRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

El dominio de señalización heterólogo puede ser o puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 31; SEC ID nº 32 o SEC ID nº 33, respectivamente, o una variante de las mismas que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

El dominio de señalización heterólogo puede ser o puede comprender un dominio de señalización inhibitorio.

Por ejemplo, el dominio de señalización inhibitorio puede comprender el endodominio de CD148 o CD45. CD148 y CD45 se ha demostrado que actúan naturalmente sobre las tirosinas fosforiladas corriente arriba de la señalización de RCT.

CD148 es una proteína tirosina fosfatasa de tipo receptor que regula negativamente la señalización de RCT mediante la interferencia con la fosforilación y la función de PLC γ 1 y LAT.

CD45 presente sobre todas las células hematopoyéticas es una proteína tirosina fosfatasa que es capaz de regular la transducción de señales y las respuestas funcionales, nuevamente mediante fosforilación de PLC γ 1.

Un dominio de señalización inhibitorio puede comprender la totalidad o parte de una tirosina fosfatasa de tipo receptor. La fosfatasa puede interferir con la fosforilación y/o la función de elementos que participan en la señalización de las células T, tal como PLC γ 1 y/o LAT.

El dominio de señalización inhibitorio puede ser o comprender el endodominio de ICOS, CD27, BTLA, CD30, GITR o HVEM.

El dominio de señalización inhibitorio puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID n° 34 a n° 39 o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%.

SEC ID n° 34 - endodominio de ICOS
CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL

SEC ID n° 35 - endodominio de CD27
QRRKYRSNKGESPVPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

SEC ID n° 36 - endodominio de BTLA

RRHQGKQNELSDTAGREINLVD AHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCL
EENKPGIVYASLNHSGVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

SEC ID n° 37 - endodominio de CD30

HRRACRKRIRQKLHLCPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGA
AYLESPLQDASAPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAE LPEGRGLAGPAEPE
LEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMSVEEEGKEDPLPTAASGK

SEC ID n° 38 - endodominio de GITR
QLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV

SEC ID n° 39 - endodominio de HVEM
CVKRRKPRGDDVVKVIVSVQKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH

Una secuencia de variante puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% respecto a la SEC ID n° 34 a n° 39, con la condición de que la secuencia proporcione un dominio de señalización intracelular eficaz.

Convenientemente, la proteína de fusión puede ser o puede comprender cualquiera de las secuencias mostradas en SEC ID n° 40 a n° 45.

(SEC ID n° 40) - endodominio de CD28 fusionado con el extremo aminoterminal de ZAP de longitud completa

MRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGMPDPAAH
LPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRS LGGYVLSLVHDVRFHHP IERQLNGTYA IAGGKAH
CGPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVFDC LRDAMVRD YVRQTWKLEGEALEQAIISQAP
QVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQT DGKFLLRPRKEQGT YALSLIYGKTVYHYLISQDK
AGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLK LKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLP AHPSTLTHTPQRRIDTL
NSDGYTPEPARITSPDKPRPMDTSVYESPSYSDPEELKDKKFLKRDNL IADIELGCGNFGSVRQGVY
RMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLV
GKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTARS

AGKWPLKWYAPPECINFRKFSSRSVDWSYGVTMWEALSYGQKPYKKMKGPVMAFIEQGRMECPPECPPE
LYALMSDCWIYKWEDRPDFTLVEQRM RACYSLASKVEGPPGSTQKAEACA

(SEC ID nº 41) - endodominio de 41BB fusionado con extremo aminoterminal de ZAP de longitud completa

MKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELSGGGGSGGGSGGGSGGGSGMPDFAA
HLFFFYGSISRRAEEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAIAAGGKA
HCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTKLEGEALEQAIISQA
PQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTYSLSIYGKTVYHYLISQD
KAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPHPSTLTHPQRRIDT
LNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKFLKRDNLIIADIELGCGNFGSVRQGV
YRMRKKQIDVAIKVLKQTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVEMAGGGPLHKFL
VGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYTTAR
SAGKWLKWAPECINFRKFSRSDVWSYGVTMWEALSYGQKPKMKMGPEVMAFIEQGRMECPPECPP
ELYALMSDCWIYKWEDRPDLTVEQMRACYYSLASKVEGPPGSTQKAEAAACA

(SEC ID nº 42) - endodominio de OX40 fusionado con extremo aminoterminal de ZAP de longitud completa

MRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKISGGGGSGGGSGGGSGGGSGMPDFAAHLFFFY
GSISRRAEEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAIAAGGKAHCGPAE
LCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTKLEGEALEQAIISQAPQVEKL
IATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTYSLSIYGKTVYHYLISQDKAGKYL
IPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPHPSTLTHPQRRIDTNSDGY
TPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKFLKRDNLIIADIELGCGNFGSVRQGVYRMRKK
QIDVAIKVLKQTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVEMAGGGPLHKFLVGKREE
IPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYTTARSAGKNP
LKWYAPECINFRKFSRSDVWSYGVTMWEALSYGQKPKMKMGPEVMAFIEQGRMECPPECPPELYALM
SDCWIYKWEDRPDLTVEQMRACYYSLASKVEGPPGSTQKAEAAACA

(SEC ID nº 43) - endodominio de CD28 fusionado con extremo aminoterminal de dominio SH2 de PTPN6

MRSKRSLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGMVRWFHR
DLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDFFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFATLTTELVE
YYTQQQGVLDQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLRESLSQPGDFVL
SVLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETDFSLDLDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPY

(SEC ID nº 44) - endodominio de 41BB fusionado con extremo aminoterminal de dominio SH2 de PTPN6

MKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELSGGGGSGGGSGGGSGGGSGMVRWFH
RDLGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDFFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFATLTTELVE
EYYTQQQGVLDQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLRESLSQPGDFV
LSVLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETDFSLDLDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPY

(SEC ID nº 45) - endodominio de OX40 fusionado con extremo aminoterminal de dominio SH2 de PTPN6

MRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKISGGGGSGGGSGGGSGGGSGMVRWFHRDLSGL
DAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDFFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFATLTTELVEYYTQQ
QGVLDQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLRESLSQPGDFVLSVLSD
QPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETDFSLDLDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPY

- 5 Convenientemente, la proteína de fusión puede comprender la secuencia mostrada en cualquiera de SEC ID nº 40 a nº 45 o una variante de las mismas que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

DOMINIO DE QUINASA

- 10 El dominio de señalización heterólogo puede ser un dominio de quinasa. Por ejemplo, el dominio de señalización heterólogo puede comprender un dominio de quinasa AKT o un dominio de quinasa JAK.

- 15 Akt, también conocida como proteína quinasa B (PKB), es una proteína quinasa específica de serina/treonina que desempeña un papel clave en múltiples procesos celulares, tales como el metabolismo de la glucosa, la apoptosis, la proliferación celular, la transcripción y la migración celular.

- 20 Tras la activación de los RCT, las células T secretan IL2, que promueve la supervivencia y la proliferación. Sin embargo, dicha secreción es transitoria y las células T que resultan activadas y expandidas in vitro se vuelven dependientes de IL2 exógeno para la supervivencia. Mediante el incremento de la fosforilación por AKT tras la fosforilación de ITAM asociada a la activación de RCT o RAQ, puede reducirse o eliminarse la dependencia de las células T activadas respecto de IL2 exógeno y potenciarse su proliferación y supervivencia.

El dominio de quinasa Akt se muestra en SEC ID nº 46.

SEC ID nº 46 - dominio de quinasa Akt

AEEMEVSLAKPKHRVTMNEFEYLKLLGKGTFGKVILVKEKATGRYYAMKILKKEVIVAKDEVAHTLTENR
 VLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSEDRARFYGAEIVSALDYLHSEKNV
 VYRDLKLENLMLDKDGHIKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWGLGVVMY
 EMMCGRLPFYFNQDHEKLFELILMEEIRFPRTLGPPEAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAG
 IVWQHVVYEKKLSPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSMCEVDSERRPHFPQFSYSASGTA

- 5 El dominio de señalización heterólogo puede ser o puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 46, o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, con la condición de que la secuencia proporcione un dominio de quinasa eficaz.

- 10 A título de ejemplo, la proteína de fusión puede ser o puede comprender cualquiera de las secuencias mostradas en SEC ID nº 47 a nº 49 y nº 62 que contienen un dominio ZAP70-SH2 fusionado directamente con un dominio de quinasa Akt, un dominio ZAP70-SH2 fusionado con un dominio de quinasa Akt mediante un conector, un ZAP70 mutado para ser no funcional y fusionado con un dominio de quinasa Akt y un dominio dual SHP-2 SH2 fusionado con un dominio de quinasa Akt, respectivamente.

SEC ID nº 47 - dominio ZAP70-SH2 fusionado directamente con un dominio de quinasa Akt

MPDPAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSGLGGYVLSLVHDVRFHFFPIERQLNGTYA
 IAGGKAHCGLPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTKLEGEALEQ
 AIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTYSLSIYGKTVYH
 YLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKLLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPHPSTLTHP
 AEEMEVSLAKPKHRVTMNEFEYLKLLGKGTFGKVILVKEKATGRYYAMKILKKEVIVAKDEVAHTLTENR
 VLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSEDRARFYGAEIVSALDYLHSEKNV
 VYRDLKLENLMLDKDGHIKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWGLGVVMY

EMMCGRLPFYFNQDHEKLFELILMEEIRFPRTLGPPEAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAG
 IVWQHVVYEKKLSPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSMCEVDSERRPHFPQFSYSASGTA

SEC ID nº 48 - dominio ZAP70-SH2 fusionado con un dominio de quinasa Akt mediante un conector

MPDPAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSGLGGYVLSLVHDVRFHFFPIERQLNGTYA
 IAGGKAHCGLPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTKLEGEALEQ
 AIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTYSLSIYGKTVYH
 YLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKLLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPHPSTLTHP
 SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAEEMEVSLAKPKHRVTMNEFEYLKLLGKGTFGKVILVKEKATGRYYAMK
 ILKKEVIVAKDEVAHTLTENRVLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSEDR
 ARFYGAEIVSALDYLHSEKNVVYRDLKLENLMLDKDGHIKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTPEYLAPE
 VLEDNDYGRAVDWGLGVVMYEMMCGRLPFYFNQDHEKLFELILMEEIRFPRTLGPPEAKSLLSGLLKKDPK
 QRLGGGSEDAKEIMQHRFFAGIVWQHVVYEKKLSPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSM
 CEVDSERRPHFPQFSYSASGTA

SEC ID nº 49 - ZAP70 mutado para ser no funcional y fusionado con un dominio de quinasa Akt

MPDPAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSGLGGYVLSLVHDVRFHFFPIERQLNGTYA
 IAGGKAHCGLPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTKLEGEALEQ
 AIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTYSLSIYGKTVYH
 YLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKLLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPHPSTLTHP
 AEEMEVSLAKPKHRVTMNEFEYLKLLGKGTFGKVILVKEKATGRYYAMKILKKEVIVAKDEVAHTLTENR
 VLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSEDRARFYGAEIVSALDYLHSEKNV
 VYRDLKLENLMLDKDGHIKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWGLGVVMY
 EMMCGRLPFYFNQDHEKLFELILMEEIRFPRTLGPPEAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAG
 IVWQHVVYEKKLSPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSMCEVDSERRPHFPQFSYSASGTA

SEC ID n° 62 - dominio SH2 de SHP-2 dual fusionado con un dominio de quinasa Akt

WFHPNITGVEAENLLLTRGVDGSFLARPSKSNPGDFTLSVRRNGAVTHIKIQNTGDYYDLYGGEKFATLA
 ELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIELKYP LNCADPTSERWFHGLSGKEAEKLLTEKGKHGSFLVRESQSHPG
 DFVLSVRTGDDKGESNDGKSKVTHVMIRCQELKYDVGGGERFDSLTDLVEHYKKNPMVETLGTVLQKQP
 LNTTRINAEEMEVS LAKPKHRVTMNEFEYLKLLGKGTFGKVILVKEKATGRYYAMKILKKEVIVAKDEVA
 HTLTENRVLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSEDRARFYGAEIVSALDY
 LHSEKNVVYRDLKLENMLDKDGHKIDTDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWW
 GLGVVMEYEMMCGRLPFYNQDHEKLFELILMEEIRFPRTLGPPEAKSLLSGLLKDPKQRLGGGSEDAKEIM
 QHRFFAGIVWQHVEKKLSPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSMECVDSERRPHFPQFS
 YSASGTA

La proteína de fusión puede comprender la secuencia mostrada en cualquiera de SEC ID n° 47 a n° 49 o n° 62, o una variante de las mismas que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

La quinasa Janus (JAK) es una familia de tirosina quinasa no receptoras intracelulares que transducen las señales mediadas por citoquinas mediante la ruta JAK-STAT. Los cuatro elementos de la familia de JAK son: quinasa Janus 1 (JAK1), quinasa Janus 2 (JAK2), quinasa Janus 3 (JAK3) y tirosina quinasa 2 (TYK2).

SEC ID n° 50 - dominio que contiene quinasa de JAK2

RNEDLIFNESLGQGTFTKIFKGVRRVGDYQGLHETEVLLKVLDAHRNYSSESFFEAASMMSKLSHKHLV
 LNYGVCVCGDENILVQEFVKFGSLDYLKKNKNCINILWKLEVAQLAWAMHFLEENTLIHGNCVAKNIL
 LIREEDRKTGNPPFIKLSDPGISITVLPKDILQERIPWVPPECIENPKNLNLATDKWSFGTTLWEICSGG

DKPLSALDSQRKLQFYEDRHQLPAPKWAE LANLINNCDYEPDFRPSFRAIIRDNLNLSLFTPDYELLTEND
 MLPNMRIGALGFSGAFEDRDPTQFEERHLKFLQQLGKGNFGSVEMCRYDPLQDNTGEVVAVKKLQHSTEE
 HLRDFEREIEILKSLQHDNIVKYKVCYSAGRRLKLIMEYLPYGSRLDYLQKHKERIDHIKLLQYTSQI
 CKGMEYLGTKRYIHRDLATRNILVENENRVKIGDFGLTKVLPQDKEYYKVEKPGESPIFWYAPESLTESK
 FSVASDVWSFGVVLVYELFTYIEKSKSPAEFMRMIGNDKQGQMIVFHLIELLNKNGRLPRPDGCPDEIYM
 IMTECWNNNVNQRP SFRDLALRVDQIRDNM

DOMINIO DE PROTEASA

La presente exposición proporciona además una proteína de fusión que comprende: (i) un dominio SH2 de una proteína que se une a un ITAM o una proteína que contiene ITIM y (ii) un dominio de proteasa.

El dominio de proteasa puede ser cualquier proteasa que es capaz de cortar en una secuencia de reconocimiento específica. De esta manera, el dominio de proteasa puede ser cualquier proteasa que permita la separación de un único polipéptido en dos polipéptidos diferentes mediante corte en una secuencia diana específica.

El dominio de proteasa puede ser un dominio de proteasa del virus del grabado del tabaco (TeV, por sus siglas en inglés).

La proteasa del TeV es una cisteína proteasa altamente específica de secuencia que es una proteasa de tipo quimi tripsina. Es muy específica para su sitio diana de corte y, por lo tanto, se utiliza frecuentemente para el corte controlado de proteínas de fusión tanto in vitro como in vivo. El sitio de corte de TeV de consenso es ENLYFQ\S (donde '\ ' denota el enlace peptídico cortado). Las células de mamífero, tales como las células humanas, no expresan la proteasa de TeV endógenamente.

De acuerdo con lo anterior, el sitio de reconocimiento de corte de TeV se muestra en SEC ID n° 51.

SEC ID n° 51 - sitio de corte de TeV

ENLYFQS

El dominio de proteasa de TeV se muestra en SEC ID n° 52.

SEC ID n° 52

SLFKGPRDYNPISSSTICHLTNE SDGHTTSLYGIGFGPFIITNKH LFRRNNGTLLVQSLHGVFKVKN TTTL
 QQHLIDGRDMI IIRMPKDFPPFPQKLKFPREPQREERICLVTTNFQTKSMSSMVSDT SCTFPSSDGIFWKH
 WIQTKDQGCGSPLVSTRDGFIVGIHSASNFTNTN NYFTSVPKNFMELLTNQEAQQVWSGWRLNADSVLWG
 GHKVFMSKPEEPFQPVKEATQLMNELVYSQ

De acuerdo con lo anterior, el dominio de proteasa puede ser o puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID

nº 52, o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, con la condición de que la secuencia proporcione una función de proteasa eficaz.

- 5 A título de ejemplo, la proteína de fusión puede ser o puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 53 o nº 54, que contiene un dominio ZAP70-SH2 fusionado con una secuencia de proteasa de TeV o un dominio PTPN6-SH2 fusionado con una secuencia de proteasa de TeV, respectivamente.

SEC ID nº 53

MPDPAHLFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRS LGGYVLSLVHDVRFHFFPIERQLNGTYA
IAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQ
AIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTYSLSLIYKTVYH
YLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPSTLTHP
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSLFKGRDYNPISSTICHLTNE SDGHTTSLYGIGFGPFIITNKLFRRN
NGTLLVQSLHGVFKVKNNTTLLQQLIDGRDMIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTTNFQTKSM
SSMVSDTSCTFPSSDGIFWKHWIQTGQCGSPLVSTRDGFIVGIHSASNFTNTNNYFTSVPKNFMELLT
NQEAQQWVSGWRLNADSVLWGGHKVFMSPKEEPFQPVKEATQLMNELVYSQ

SEC ID nº 54

MVRWFHRDL SGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGD FSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFA
TLTELVEYTTQQQGVLDQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSSGGQAETLLQAKGEPWTFVLVRESLS
QPGDFVLVSLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETFDLSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLR
QFYSSGGGSSLFKGRDYNPISSTICHLTNE SDGHTTSLYGIGFGPFIITNKLFRRNNGTLLVQSLHG
VFKVKNNTTLLQQLIDGRDMIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTTNFQTKSMSSMVSDTSCTF
PSSDGIFWKHWIQTGQCGSPLVSTRDGFIVGIHSASNFTNTNNYFTSVPKNFMELLTNQEAQQWVSGW
RLNADSVLWGGHKVFMSPKEEPFQPVKEATQLMNELVYSQ

- 10 La proteína de fusión puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 53 o nº 54, o una variante de las mismas que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

El dominio SH2 y el dominio heterólogo de la proteína de fusión pueden estar separados por un conector a fin de separar espacialmente el dominio SH2 y el dominio heterólogo.

15 SEÑAL TRANSCRIPCIONAL

- Una proteína de fusión que comprende una proteasa, tal como se indica en la sección anterior, puede coexpresarse en una célula con una proteína anclada a membrana que presenta un sitio de corte de proteasa. El corte de la proteína anclada a membrana en el sitio de proteasa liberará la parte distal a la membrana de la proteína.

La proteína anclada a membrana puede ser, por ejemplo, un factor de transcripción anclado a membrana. Al producirse el corte, el transcrito resulta liberado de su anclaje y es libre de transitar hasta el núcleo.

- 25 Una fusión entre el dominio SH2 de ZAP70 o el dominio SH2 de PTPN6 y un dominio de proteasa resultará en la captación proximal a membrana de la proteasa después de la fosforilación de ITAM o ITIM, respectivamente.

- La fosforilación de los dominios ITAM o ITIM resulta en la captación de SH2 de ZAP70 o SH2 de PTPN6 fusionado con el dominio de proteasa, respectivamente, en la zona proximal a membrana. Lo anterior resulta en que el factor de transcripción es cortado de su anclaje y transferido al núcleo. Lo anterior puede presentar muchas aplicaciones: por ejemplo, con la activación, la célula T puede programarse para expresar factores de transcripción que actúan evitando la diferenciación de la célula T. Por ejemplo, con la activación, la célula T puede programarse para expresar una citoquina, tal como IL2, IL7 o IL15, que puede actuar para estimular la proliferación y la supervivencia de la célula T, o IL12 que puede convertir un microambiente tumoral hostil en uno que favorece el rechazo inmunitario de un tumor.

En particular, se proporciona una célula que coexpresa:

- (i) una proteína de fusión que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un ITAM fosforilado, y
(ii) un factor de transcripción anclado a membrana,

en la que el factor de transcripción, al ser liberado del anclaje a membrana, incrementa la expresión de IL2, IL7 y/o IL15 en la célula.

Se proporciona además una célula que coexpresa:

- (i) una proteína de fusión que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un ITIM fosforilado, y
(ii) un factor de transcripción anclado a membrana,

en la que el factor de transcripción, al ser liberado del anclaje a membrana, incrementa la expresión de IL2 en la célula.

Sitio de reconocimiento de proteasa

5 El sitio de reconocimiento de reconocimiento de proteasa puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que permita que el dominio de proteasa de la proteína de fusión corte específicamente el factor de transcripción anclado a membrana entre el anclaje de membrana y el factor de transcripción. Por ejemplo, en una realización, el dominio de proteasa es un dominio de proteasa de TeV y sitio de reconocimiento de proteasa es un sitio de reconocimiento de proteasa de TeV.

10 Anclaje de membrana

El anclaje de membrana puede ser cualquier secuencia, señal o dominio que sea capaz de localizar el factor de transcripción y el sitio de reconocimiento de proteasa proximal a una membrana. Por ejemplo, el anclaje de membrana puede ser una señal de miristilación o un dominio transmembranal.

Convenientemente, un dominio transmembranal puede ser cualquier estructura proteica que sea termodinámicamente estable en una membrana. Lo anterior es típicamente una hélice alfa que comprende varios residuos hidrofóbicos. El dominio transmembranal de cualquier proteína transmembrana puede utilizarse para suministrar la parte transmembranal. La presencia y envergadura de un dominio transmembranal de una proteína puede ser determinado por el experto en la materia utilizando el algoritmo TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Además, dado que el dominio transmembranal de una proteína es una estructura relativamente simple, es decir, una secuencia polipeptídica que se predice que forma una hélice alfa hidrofóbica de longitud suficiente para atravesar toda la membrana, también puede utilizarse un dominio TM de diseño artificial (el documento nº US 7052906 B1 describe componentes transmembranales sintéticos).

El dominio transmembranal puede derivarse de CD28, que proporciona una buena estabilidad.

30 Factor de transcripción

El factor de transcripción puede ser cualquier factor de transcripción seleccionado para estimular una respuesta deseada después de la fosforilación de los motivos ITAM o ITIM relevantes.

El factor de transcripción puede ser natural o artificial. Los factores de transcripción artificiales pueden derivarse de, por ejemplo, TALEN, ensamblajes de dedos de cinc o Crispr/CAS9, coexpresándose este último con un ARNm guía.

Preferentemente, el factor de transcripción contendrá una señal de localización nuclear para ayudar a su transporte hasta la nucleasa después del corte por el dominio de proteasa.

40 A título de ejemplo, la secuencia de ácido nucleico (ii) (que codifica una proteína que comprende un factor de transcripción anclado a membrana que comprende: (i) un anclaje a membrana, (ii) un sitio de reconocimiento de proteasa, y (iii) un factor de transcripción) puede codificar una proteína que consiste en, o que comprende, la secuencia mostrada en SEC ID nº 55, que contiene un dominio RQR8, un dominio transmembranal CD4-Endotox1, un sitio de reconocimiento de proteasa de TeV y un factor de transcripción VP16-GAL4.

45 SEC ID nº 55

```
MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCS
GGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFC
VRCRHRRRQAERMAQIKRVVSEKKTAQAPHRFQKTCSPISGGGGSENLYFQMPKKRKVAPPTDVSLGDE
LHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDSPGPGFTPHDSAPYGALDMADFEFEQMFTDALGIDEYGGSGG
GSMQILVASDATMKLLSSIEQACDICRLKKLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVE
SRLERLEQLFLIFPREDLDMILKMSLQDIKALLTGFLVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPPLTLRQHRIS
ATSSEESSNKGQRQLTV
```

Convenientemente, la proteína puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 55 o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

50 RECEPTOR

La presente exposición proporciona además un constructo de ácidos nucleicos que comprende: (a) una secuencia de ácido nucleico codificante de una proteína de fusión según el primer aspecto adicional de la presente exposición que comprende un dominio SH2 de PTPN6 o una proteína truncada según el tercer aspecto adicional de la presente exposición, y (b) una secuencia de ácido nucleico codificante de un receptor que comprende un endodominio que contiene ITIM.

SEÑAL DE CASTRACIÓN

Una proteína de fusión que comprende una proteasa, tal como se ha indicado anteriormente, puede coexpresarse en una célula con un receptor diana que comprende un sitio intracelular de corte de proteasa. El corte del receptor diana en el sitio de proteasa liberará una parte intracelular distal respecto a la membrana del receptor diana.

El receptor diana puede ser, por ejemplo, un receptor de células T (RCT) o un receptor de antígeno quimérico (RAQ).

El receptor puede comprender un endodominio activador o coestimulador situado en el extremo de la parte intracelular de la proteína. El corte en el sitio de corte de proteasa a continuación elimina el endodominio activador o coestimulador del RAQ diana, reduciendo o bloqueando la activación de las células T mediada por el receptor diana.

Alternativamente, el receptor diana puede comprender un endodominio inhibitorio situado en el extremo de la parte intracelular de la proteína. El corte en el sitio de corte de proteasa a continuación elimina el endodominio inhibitorio del RAQ diana, "activando" el potencial de activación de las células T mediado por el receptor diana.

El endodominio inhibitorio puede comprender, por ejemplo, un endodominio CD148 o CD45 o un endodominio que contiene ITIM de una proteína, tal como PD1, PDCD1, BTLA4, LILRB1, LAIR1, CTLA4, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL1 o KIR3DL3.

A título de ejemplo, el receptor diana puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 56, que contiene un RAQ contra CD33 que contiene un endodominio ITIM de PD-1.

SEC ID nº 56

```
MAVPTQVLGLLLWLTDAECDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPKAPKLLIYD
TNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLPEDFATYYCQHYKNYPLTFGGGTKLEIKRSGGGSGGGSGG
GGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKLEWVSSIISLNGGSTY
YRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGGTLVTVSSMDPATTTKP
VLRTSPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRARGTI
GARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEYATIVFPPSGMGTSSPARRGSADG
PRSAQPLRPEDGHCSWPL
```

Convenientemente, la proteína puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 56 o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

En donde el receptor comprende un sitio de corte de proteasa entre un dominio transmembranal y un endodominio activador, la proteína de fusión de señal de castración puede utilizarse para inhibir el receptor. Por ejemplo, podría construirse un primer RAQ en el que su endodominio se encuentre separado del dominio transmembranal por un sitio de corte de proteasa. Un segundo RAQ que reconozca un antígeno diferente podría comprender un endodominio que contiene ITIM. El reconocimiento del antígeno afín del segundo receptor resultaría en la captación de la proteína de fusión de señal de castración en la membrana y el posterior corte en el sitio de reconocimiento de proteasa. Dicho corte separaría el endodominio activador respecto del primer receptor y evitaría la activación y propagación de la señal a partir de dicho receptor.

Lo anterior resultaría en una puerta lógica de tipo "Y/NO", en la que se transmitiría una señal sostenida únicamente en el caso de que el primer RAQ resulte activado aisladamente (es decir, en el caso de que el primer RAQ se una a su antígeno afín pero el segundo RAQ no se une a su antígeno afín). Dichas 'puertas lógicas' pueden resultar útiles, por ejemplo, debido a que es relativamente raro que la presencia (o ausencia) de un único antígeno describa eficazmente un cáncer, lo que puede conducir a una falta de especificidad. La utilización como diana de la expresión de antígenos sobre las células normales conduce a toxicidad en la diana, fuera del tumor. En algunos cánceres, un tumor se define mejor a partir de la presencia de un antígeno (típicamente un antígeno específico de tejido) y la ausencia de otro antígeno que sí se encuentra presente sobre células normales. Por ejemplo, las células de leucemia mieloide aguda (LMA) expresan CD33. Las células madre normales expresan CD33, aunque expresan además CD34, mientras que las células de LMA son típicamente negativas para CD34. La utilización como diana de CD33 solo para tratar la LMA se asocia a toxicidad significativa, ya que reduce el número de células madre normales. Sin embargo, la utilización como diana específica de células positivas para CD33, pero no positivas para CD34 evitaría dicha considerable toxicidad fuera de diana.

En la Tabla 2 se muestran potenciales parejas de antígenos para dicha puerta 'Y/NO'.

TABLA 2

Enfermedad	TAA	Célula normal que expresa TAA	Antígeno expresado por células normales pero no por células cancerosas
LMA	CD33	Células madre	CD34

Enfermedad	TAA	Célula normal que expresa TAA	Antígeno expresado por células normales pero no por células cancerosas
Mieloma	BCMA	células dendríticas	CD1c
LLC-B	CD160	Células asesinas naturales	CD56
Cáncer de próstata	PSMA	Tejido neural	NCAM
Cáncer de intestino	A33	Epitelio intestinal normal	HLA clase I

A título de ejemplo, el receptor que comprende un sitio de corte de proteasa entre un dominio transmembranal y un endodominio activador puede ser la secuencia mostrada en SEC ID nº 57, que contiene un RAQ contra CD19 con un endodominio CD3-zeta escindible.

SEC ID nº 57

```
MSLPVTALLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIY
HTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAITYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITKAGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSSETTYN
SALKSRLLTIKDNSKQVFLKMNSLQTDITAIYCAKHYYGGSYAMDYWGQGSVTVSSDPTTTPAPRP
PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGGLACYSLLVTVAFIFWVRCRHR
RRQAERMAQIKRVVSEKKTAQAPHRFQKTCSPISGGGGSENLYFQMRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR
```

Convenientemente, el receptor puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 57 o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

En el caso de que el receptor comprenda un endodominio activador fusionado con un endodominio inhibitorio mediante un sitio de corte de proteasa, puede utilizarse una proteína de fusión de señal de castración para activar los dominios de señalización artificiales. Por ejemplo, podría construirse un primer RAQ en el que su endodominio comprende un endodominio activador fusionado con un dominio inhibitorio mediante un sitio de corte de proteasa. Un segundo RAQ que reconozca un antígeno diferente podría comprender un endodominio que contiene ITIM. El reconocimiento del antígeno afín del segundo receptor resultaría en la captación de la proteína de fusión de señal de castración en la membrana y el posterior corte del endodominio inhibitorio respecto del endodominio activador del primer receptor. El corte, y de esta manera la separación, del dominio inhibitorio respecto del dominio activador permitiría la activación del primer RAQ tras la unión de antígeno y, por lo tanto, la activación de la señalización mediante el primer receptor.

Lo anterior resultaría en una puerta lógica de tipo "Y" en la que la señalización productiva sólo se produciría en el caso de activación de tanto el primer como el segundo receptor. Dichas 'puertas lógicas' resultan útiles, por ejemplo, debido a que la mayoría de cánceres no pueden diferenciarse de los tejidos normales a partir de un único antígeno. Por lo tanto, se produce considerable toxicidad "en la diana fuera del tumor", en la que tejidos normales resultan dañados por la terapia. Para algunos cánceres, la utilización como diana de la presencia de dos antígenos del cáncer puede resultar más selectiva y, por lo tanto, más eficaz que utilizar como diana uno solo. Por ejemplo, la leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) es una leucemia común que actualmente se trata utilizando como diana CD19. Lo anterior trata el linfoma, aunque también agota todo el comportamiento de células B de manera que el tratamiento presenta un considerable efecto tóxico. La LLC-B presenta un fenotipo inusual en el aspecto de que se coexpresan CD5 y CD19. Mediante la utilización como diana de sólo las células que expresan CD5 y CD19, resultaría posible reducir considerablemente la toxicidad en la diana fuera del tumor.

En la Tabla 3 se muestran potenciales parejas de antígenos para dicha puerta lógica 'Y'.

Tabla 3

Tipo de cáncer	Antígenos
Leucemia linfocítica crónica	CD5, CD19
Neuroblastoma	ALK, GD2
Glioma	EGFR, Vimentina
Mieloma múltiple	BCMA, CD138
Carcinoma de células renales	Anhidrasa carbónica IX G250
LLA-T	CD2, N-cadherina
Cáncer de próstata	PSAM, hepsina (u otras)

A título de ejemplo, el receptor que comprende un endodominio activador fusionado con un dominio inhibitorio mediante un sitio de corte de proteasa puede ser la secuencia mostrada en SEC ID nº 58, que contiene un RAQ contra CD19 con un endodominio CD3-zeta y un endodominio de CD148 escindible.

SEC ID nº 58

MSLPVTALLPLALLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIY
 HTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITKAGGGSGGGGS
 GGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYN
 SALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSDPTTTPAPRP
 PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKF
 SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEI
 GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRENLYFQMAVFGCIFGALVIVTVGGFIFWRKKR
 KDAKNEVSFSQIKPKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNR
 YNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLT
 CVEQGRTKCEEYWPSSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSSESHPLRQFHFTSWPDHGVDP
 TTDLLINFRYLVRDYMKSPPESPILVHCSAGVGRGTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGVIVDLRMHRPL
 MVQTEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTINGYIA

Convenientemente, el receptor puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 58 o una variante de la misma que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

SEÑAL DE BLOQUEO

La presente exposición proporciona una proteína truncada que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosinas (ITAM) fosforilado pero que no presenta un dominio de quinasas.

Por ejemplo, la proteína truncada puede comprender el dominio SH2 de ZAP70 pero no presentar el dominio de quinasas de ZAP70. En otras palabras, la presente exposición proporciona una proteína truncada que: (i) comprende la secuencia mostrada en SEC ID nº 2, pero no comprende la secuencia mostrada en SEC ID nº 26.

La sobreexpresión del dominio SH2 de ZAP70 resulta en la competición con ZAP70 de longitud completa/de tipo salvaje. Debido a que ZAP70 truncado no puede propagar señales, se reduce la transmisión de la señal en proporción a la relación entre ZAP70 de tipo salvaje y la proteína truncada. Lo anterior puede resultar útil para reducir la fuerza de la activación de las células T, por ejemplo para evitar la sobreactivación de las células T que puede resultar en el agotamiento de las células T, la muerte celular inducida por activación y, en un contexto clínico, puede resultar en tormentas de citoquinas.

Una proteína truncada de la invención comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosinas (ITIM) fosforilado pero que no presenta un dominio de fosfatasa. Por ejemplo, la proteína truncada puede comprender el dominio SH2 de PTPN6 pero no presentar el dominio de PTPN6 fosfatasa. En otras palabras, una proteína truncada de la invención puede comprender la secuencia mostrada en SEC ID nº 6, pero no comprende la secuencia mostrada en SEC ID nº 27.

En dicho caso, la señalización de ITIM puede estar reducida en proporción a la relación entre PTPN6 de tipo salvaje y la proteína truncada. Lo anterior puede resultar útil para reducir las señales inhibitorias, tales como la señalización de PD1. Lo anterior puede presentar aplicación en el caso de que las células T presenten como diana un tumor que sobreexpresa PDL1 (o receptores inhibitorios similares) para evadir el rechazo inmunitario.

La utilización de una señal de bloqueo o una señal cruzada tal como se ha indicado anteriormente, ofrece una ventaja significativa respecto a los enfoques de bloqueo de punto de control inmunitario tradicionales, que típicamente bloquean la interacción de un único ligando/receptor, tal como PD-L1/PD1, con un anticuerpo. Tal como se ha explicado anteriormente, la clase de receptores inmunitarios inhibitorios contiene muchos elementos con redundancias y patrones de expresión que fluctúan con el estado de las células T. La utilización de un anticuerpo o un ligando/receptor recombinante puede bloquear eficazmente un receptor inhibitorio, aunque no afectará a las señales inhibitorias transmitidas desde el resto. La edición genómica de receptores inhibitorios individuales (Menger et al., Cancer Res. 76(8):2087-93, 15 de abril de 2016) presenta limitaciones similares. Las estrategias de fusiones entre receptores inhibitorios individuales y dominios coestimuladores también adolece de limitaciones similares (Liu et al., Cancer Res. 76(6):1578-90, 15 de marzo de 2016).

El método de la presente exposición bloqueará (y, dependiendo de la estrategia, reinterpretará) señales inhibitorias transmitidas mediante un ITIM. Por lo tanto, una clase entera de señales inhibitorias resulta modulada. Se proporciona una lista de receptores inhibitorios que señalizan a través de los ITIM en la Tabla II de Odorizzi y Wherry, J. Immunol. 188:2957-2965, 2012. Entre ellos se incluyen: PD1, BTLA, 2B4, CTLA-4, GP49B, Lair-1, Pir-B, PECAM-1, CD22, Siglec 7, Siglec 9, KLRG1, ILT2, CD94-NKG2A y CD5.

ÁCIDO NUCLEICO

En un aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína truncada según la presente invención.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos “polinucleótido”, “nucleótido” y “ácido nucleico” pretenden ser sinónimos entre sí.

El experto en la materia entenderá que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como consecuencia de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que el experto en la materia puede, utilizando técnicas rutinarias, realizar sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos indicados en la presente memoria a fin de reflejar el uso de los codones de cualquier organismo huésped particular en el que deben expresarse los polipéptidos.

Los ácidos nucleicos según la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. También pueden ser polinucleótidos que incluyen dentro de los mismos nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen de la técnica varios tipos diferentes de modificación de los oligonucleótidos. Entre ellos se incluyen esqueletos metilfosfonato y fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la utilización tal como se indica en la presente memoria, debe entenderse que los polinucleótidos pueden modificarse mediante cualquier método disponible la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de potenciar la actividad in vivo o periodo de vida de los polinucleótidos de interés.

Los términos “variante”, “homólogo” o “derivado” en relación a una secuencia de nucleótidos incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazamiento, delección o adición de un ácido nucleico, o más de uno, de la secuencia o a la secuencia.

CONSTRUCTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

En un aspecto, la presente invención proporciona un constructo de ácidos nucleicos que codifica una proteína truncada de la presente invención con otra proteína. El constructo de ácidos nucleicos puede comprender: una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína truncada de la presente invención y un ácido nucleico codificante de otra proteína.

La presente invención proporciona un constructo de ácidos nucleicos que coexpresa una proteína truncada de la presente invención con un receptor de antígeno quimérico. El constructo de ácidos nucleicos comprende: (i) una secuencia de ácido nucleico codificante de una proteína truncada de la presente invención, y (ii) un ácido nucleico codificante de un receptor de antígeno quimérico.

El receptor de antígeno quimérico (RAQ) puede ser un RAQ activador que comprende un endodominio que contiene ITAM, tal como CD3 zeta. El RAQ puede ser un RAQ inhibitorio que comprende un endodominio de “apagado de ligación”, tal como se indica en el documento nº WO2015/075469, que puede comprender la totalidad o parte del endodominio de una tirosina fosfatasa de tipo receptor, tal como CD148 o CD45. El RAQ puede ser un RAQ inhibitorio que comprende un endodominio de “apagado de ligación”, tal como se indica en el documento nº WO2015/075470, que puede comprender un dominio ITIM.

Las proteínas truncadas de la invención pueden utilizarse junto con una célula que expresa una combinación de “puerta lógica” de dos o más RAQ. Una puerta O comprende dos RAQ activadores tal como se indica en el documento nº WO2015/075468. Una puerta Y comprende un RAQ activador y un RAQ inhibitorio de “apagado de ligación” tal como se indica en el documento nº WO2015/075469. Y la puerta Y comprende un RAQ activador y un RAQ inhibitorio de “apagado de ligación” tal como se indica en el documento nº WO2015/075470.

De esta manera, la presente invención proporciona un constructo de ácidos nucleicos que comprende:

- (i) una secuencia de ácido nucleico codificante de una proteína truncada de la invención,
- (ii) un primer receptor de antígeno quimérico (RAQ), y
- (iii) un segundo receptor de antígeno quimérico.

En referencia al aspecto de señal de transcripción de la exposición, se proporciona un constructo de ácidos nucleicos que comprende: (i) una secuencia de ácido nucleico codificante de una proteína de fusión que comprende un dominio SH2 y un dominio de proteasa, y (ii) una secuencia de ácido nucleico codificante de un factor de transcripción anclado a membrana que comprende: un anclaje a membrana, un sitio de reconocimiento de proteasa y un factor de transcripción.

En referencia al aspecto de señal de castración de la exposición, se proporciona un constructo de ácidos nucleicos que comprende: (i) una secuencia de ácido nucleico codificante de una proteína de fusión que comprende un dominio SH2 y un dominio de proteasa (p.ej., un dominio de TeV) y (ii) una secuencia de ácido nucleico codificante de un receptor que comprende un sitio de corte de proteasa.

Por ejemplo, la presente exposición proporciona un constructo de ácidos nucleicos que comprende: (a) una secuencia de ácido nucleico codificante de una proteína de fusión que comprende: (i) dominio SH2 de PTPN6, y (ii) un dominio de proteasa (p.ej., un dominio de TeV), (b) una secuencia de ácido nucleico codificante de un receptor que comprende un sitio de corte de proteasa, y (c) una secuencia de ácido nucleico codificante de un receptor que comprende un endodominio que contiene ITIM.

El receptor puede ser un receptor de células T (RCT) o un receptor de antígeno quimérico (RAQ).

Convenientemente, la proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico (b) puede ser un receptor de células T (RCT) o un receptor de antígeno quimérico (RAQ) que comprende: (i) un sitio de corte de proteasa entre un dominio transmembranal y un endodominio activador, o (ii) un endodominio activador fusionado con un endodominio inhibidor mediante un sitio de corte de proteasa.

En el caso de que el constructo de ácidos nucleicos de la invención produzca polipéptidos discretos, tal como en el caso de que coexpresa una proteína de la invención y una RAQ, puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que habilita la expresión de ambas proteínas. Por ejemplo, puede comprender una secuencia codificante de un sitio de corte entre las dos secuencias de ácidos nucleicos. El sitio de corte puede ser autoescindible, de manera que al producir el polipéptido naciente, resulta inmediatamente cortado en dos proteínas sin necesidad de ninguna actividad de corte externa.

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

SEC ID nº 59
RAEGRGSLTTCGDVEENPGP
o
SEC ID nº 60
QCTNYALLKLAGDVESNPGP

La secuencia coexpresante puede ser una secuencia interna de entrada al ribosoma. La secuencia coexpresante puede ser un promotor interno.

RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO (RAQ)

Los RAQ, que se muestran esquemáticamente en la figura 13, son proteínas transmembranales de tipo I quiméricas que conectan un dominio extracelular de reconocimiento de antígeno (ligante) con un dominio de señalización intracelular (endodominio). El ligante es típicamente un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal (mAb), aunque puede estar basado en otros formatos que comprenden un sitio de unión a antígeno de tipo anticuerpo. Habitualmente resulta necesario un dominio espaciador para aislar el ligante respecto de la membrana y para permitir una orientación adecuada. Un dominio espaciador común utilizado es Fc de IgG1. Pueden resultar suficientes espaciadores más compactos, p.ej., el tallo de CD8α e incluso únicamente la bisagra de IgG1 solo, según el antígeno. Un dominio transmembranal ancla la proteína en la membrana celular y conecta el espaciador con el endodominio.

Los diseños de RAQ iniciales presentaban endodominios derivados de las partes intracelulares de la cadena γ y de FcεR1 o CD3ζ. En consecuencia, dichos receptores de primera generación transmiten la señal inmunitaria nº 1, que resulta suficiente para inducir la eliminación por células T de células diana afines, aunque no consigue activar por completo las células T para la proliferación y supervivencia. Para superar dicha limitación, se han construido endodominios compuestos: la fusión de la parte intracelular de una molécula coestimuladora de células T con CD3ζ resulta en receptores de segunda generación que pueden transmitir una señal activadora y coestimuladora simultáneamente después del reconocimiento de antígeno. El dominio coestimulador utilizado más comúnmente es el de CD28. Lo anterior, suministra la señal coestimuladora más potente; es decir, una señal inmunitaria nº 2 que induce la proliferación de las células T. Se han descrito algunos receptores que incluyen endodominios de la familia de receptores de TNF, tales como los estrechamente relacionados OX40 y 41BB, que transmiten señales de supervivencia. Ahora se han descrito RAQ de tercera generación todavía más potentes que presentan endodominios capaces de transmitir señales de activación, proliferación y supervivencia.

Pueden transferirse ácidos nucleicos codificantes de RAQ a células T utilizando, por ejemplo, vectores retrovíricos. Pueden utilizarse vectores lentivíricos. De esta manera, puede generarse un gran número de células T específicas de cáncer para la transferencia celular adoptiva. En el caso de que el RAQ se una al antígeno diana, lo anterior resulta en la transmisión de una señal activadora a la célula T sobre la que se expresa. De esta manera, el RAQ dirige la especificidad y la citotoxicidad de la célula T para las células tumorales que expresan el antígeno diana.

Por lo tanto, los RAQ típicamente comprenden: (i) un dominio de unión a antígeno, (ii) un espaciador, (iii) un dominio transmembranal, y (iii) un dominio intracelular que comprende o se asocia a un dominio de señalización.

DOMINIO DE UNIÓN A ANTÍGENO

El dominio de unión a antígeno es la parte del RAQ que reconoce el antígeno. Se conocen de la técnica numerosos dominios de unión a antígeno, incluyendo los basados en el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, miméticos de anticuerpo y receptores de células T. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede comprender: un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal, un ligando natural del antígeno diana, un péptido con suficiente afinidad para la diana, un anticuerpo de dominio único, un ligante único artificial, tal como un Darpin (proteína de repetición de anquirina de diseño) o una cadena sencilla derivado de un receptor de célula T.

El dominio de unión a antígeno puede comprender un dominio que no se basa en el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede comprender un dominio basado en una proteína/péptido que es un ligando soluble para un receptor de superficie de célula tumoral (p.ej., un péptido soluble, tal como una citoquina o una quimioquina), o un dominio extracelular de un ligando anclado a membrana o un receptor para el que la contrapartida de la pareja de unión se expresa sobre la célula tumoral.

El dominio de unión a antígeno puede estar basado en un ligando natural del antígeno.

El dominio de unión a antígeno puede comprender un péptido de afinidad de una biblioteca combinatorial o una proteína/péptido de afinidad de diseño *de novo*.

DOMINIO ESPACIADOR

Los RAQ comprenden una secuencia espaciadora para conectar el dominio de unión a antígeno con el dominio transmembranal y separan espacialmente el dominio de unión a antígeno respecto del endodominio. Un espaciador flexible permite que el dominio de unión a antígeno se oriente en direcciones diferentes para facilitar la unión.

En aspectos de la presente invención que requieren dos RAQ, el primer y el segundo RAQ pueden comprender diferentes moléculas espaciadoras. Por ejemplo, la secuencia espaciadora puede comprender, por ejemplo, una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8 humano o el tallo de CD8 de ratón. El espaciador puede comprender alternativamente una secuencia conectora alternativa que presenta una longitud y/o propiedades espaciadoras de dominio similares, tales como región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8. Puede alterarse un espaciador de IgG1 humano para eliminar los motivos de unión a Fc.

Todos los dominios espaciadores mencionados anteriormente forman homodímeros. Sin embargo, el mecanismo no se encuentra limitado a la utilización de receptores homodiméricos y debe funcionar con receptores monoméricos con la condición de que el espaciador sea suficientemente rígido. Un ejemplo de dicho espaciador es CD2 o CD22 truncado.

Debido a que los RAQ son típicamente homodímeros (ver la figura 13a), el emparejamiento cruzado puede resultar en un receptor de antígeno quimérico heterodimérico. Lo anterior resulta indeseable por diversos motivos, por ejemplo: (1) el epítipo puede no encontrarse al mismo "nivel" sobre la célula diana de manera que un RAQ de emparejamiento cruzado puede ser capaz de solo unirse a un antígeno, ((2) el VH y el VL de los dos scFv diferentes podrían intercambiarse y cualquiera de ellos no conseguir el reconocimiento, o peor, podrían reconocer un antígeno inesperado y no predicho. Para las puertas "Y" e "Y/NO" indicadas anteriormente, el espaciador del primer RAQ puede ser suficientemente diferente del espaciador del segundo RAQ para evitar el emparejamiento cruzado, aunque suficientemente similar para la colocalización. Pueden utilizarse parejas de secuencias espaciadoras ortólogas. Son ejemplos de tallos de CD8 murinos y humanos, o alternativamente dominios espaciadores que son monoméricos, por ejemplo, el ectodominio de CD2.

Se muestran ejemplos de parejas espaciadoras que se colocan en la tabla a continuación:

Espaciador de RAQ estimulador	Espaciador de RAQ inhibitorio
CD8aSTK humano	CD8aSTK de ratón
CD28STK humano	CD8aSTK de ratón
IgG-bisagra humano	Ectodominio de CD3z humano
CD28aSTK humano	CD28STK de ratón
CD28STK humano	CD28STK de ratón
IgG-bisagra humano-CH2CH3	IgM-bisagra humano-CH2CH3CD4

DOMINIO TRANSMEMBRANAL

El dominio transmembranal es la secuencia del RAQ que atraviesa la membrana.

Un dominio transmembranal puede ser cualquier estructura proteica que sea termodinámicamente estable en una

membrana. Lo anterior es típicamente una hélice alfa que comprende varios residuos hidrofóbicos. El dominio transmembranal de cualquier proteína transmembranal puede utilizarse para suministrar la parte transmembranal de la invención. La presencia y envergadura de un dominio transmembranal de una proteína puede ser determinado por el experto en la materia utilizando el algoritmo TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Además, dado

que el dominio transmembranal de una proteína es una estructura relativamente simple, es decir, una secuencia polipeptídica que se predice que forma una hélice alfa hidrofóbica de longitud suficiente para atravesar toda la membrana, también puede utilizarse un dominio TM de diseño artificial (el documento nº US 7052906 B1 describe componentes transmembranales sintéticos).

ENDODOMINIO ACTIVADOR

El endodominio es la parte de transmisión de señales del RAQ. Puede ser parte o estar asociado al dominio intracelular del RAQ. Tras el reconocimiento del antígeno, los receptores se agregan, CD45 y CD148 nativos resultan excluidos de la sinapsis y se transmite una señal a la célula. El componente del endodominio utilizado más comúnmente es el de CD3-zeta, que contiene 3 ITAM. Lo anterior transmite una señal de activación a la célula T tras la unión del antígeno. CD3-zeta puede no proporcionar una señal de activación totalmente competente y puede requerirse una señalización coestimuladora adicional. Por ejemplo, puede utilizarse CD28 y OX40 quiméricos con CD3-Zeta para transmitir una señal proliferativa / de supervivencia, o pueden utilizarse los tres juntos.

En el caso de que un RAQ comprenda un endodominio activador, puede comprender el endodominio CD3-Zeta solo, el endodominio CD3-Zeta con el de CD28 o OX40, o el endodominio de CD28 y OX40 y el endodominio CD3-Zeta.

Cualquier endodominio que contenga un motivo ITAM puede actuar como un endodominio de activación en la presente invención. En la presente memoria se describen endodominios adecuados que contienen un motivo ITAM.

DOMINIO INHIBITORIO

En realizaciones indicadas anteriormente como puerta "Y", el primer RAQ puede comprender un endodominio activador fusionado con un endodominio inhibitorio mediante un sitio de corte de proteasa. De esta manera, el endodominio inhibitorio inhibe la activación de las células T por el primer RAQ en ausencia de activación del segundo RAQ. Con la activación del segundo RAQ, el ITIM en el endodominio del segundo RAQ resulta fosforilado y la proteína de fusión de PTPN6/dominio de proteasa es captado en la membrana. Lo anterior resulta en el corte del primer RAQ entre el endodominio activador y el endodominio inhibitorio, habilitando de esta manera la activación de la célula T.

Los endodominios inhibitorios pueden comprender cualquier secuencia que inhibe la señalización de células T por el RAQ activador en el caso de que se encuentre en el mismo endodominio.

El endodominio inhibitorio puede ser o comprender una tirosina fosfatasa, tal como una tirosina fosfatasa de tipo receptor. Un endodominio inhibitorio puede ser o comprender cualquier tirosina fosfatasa que sea capaz de inhibir la señalización de RCT al colocarse con el endodominio activador del RAQ. Un endodominio inhibitorio puede ser o comprender cualquier tirosina fosfatasa con una velocidad catalítica suficientemente rápida para los ITAM fosforilados que permita la inhibición de la señalización de RCT al colocarse con el endodominio activador del RAQ.

VECTOR

La presente invención proporciona además un vector, o kit de vectores, que comprende una o más secuencias o uno o más constructos de ácidos nucleicos según la presente invención. Dicho vector puede utilizarse para introducir una o más secuencias o constructos de ácidos nucleicos en una célula huésped de manera que exprese las proteínas codificadas por la secuencia o constructo de ácidos nucleicos.

El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido o un vector vírico, tal como un vector retrovílico o un vector lentivírico, o un vector a base de transposón o ARNm sintético.

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

CÉLULA

La presente invención se refiere además a una célula inmunitaria que comprende la proteína truncada, ácido nucleico y/o constructo de ácidos nucleicos de la presente invención.

La célula puede ser una célula inmunitaria citolítica.

Las células inmunitarias citolíticas pueden ser células T o linfocitos T que son un tipo de linfocitos que desempeñan un papel crucial en la inmunidad mediada por células. Pueden distinguirse de otros linfocitos, tales como células B y

células asesinas naturales (células NK), por la presencia de un receptor de célula T (RCT) sobre la superficie celular. Existen diversos tipos de célula T, tal como se resume posteriormente.

Las células T ayudantes (células TH) ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos inmunitarios, incluyendo la maduración de las células B en células plasmáticas y células B de memoria, y la activación de células T citotóxicas y macrófagos. Las células TH expresan CD4 sobre su superficie. Las células TH resultan activadas al ser presentadas con antígenos peptídicos por moléculas del CMH de clase II sobre la superficie de células presentadoras de antígenos (CPA). Estas células pueden diferenciarse en varios subtipos, incluyendo TH1, TH2, TH3, TH17, TH9 o TFH, que secretan diferentes citoquinas para facilitar diferentes tipos de respuesta inmunitaria.

Las células T citolíticas (células TC, o CTL) destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también participan en el rechazo del trasplante. Las CTL expresan CD28 en su superficie. Estas células reconocen sus dianas mediante la unión a antígenos asociados al CMH de clase I, que se encuentra presente sobre la superficie de todas las células nucleadas. Mediante IL-10, la adenosina y otras moléculas secretadas por las células T reguladoras, las células CD8⁺ pueden resultar inactivadas en un estado anérgico, evitando las enfermedades autoinmunitarias, tales como la encefalomiелitis autoinmune experimental.

Las células T de memoria son un subgrupo de células T específicas de antígeno que persisten a largo plazo después de la resolución de una infección. Se expanden rápidamente hasta un gran número de células T efectoras tras la reexposición a su antígeno afín, proporcionando de esta manera al sistema inmunitario "memoria" frente a infecciones pasadas. 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.

Las células T reguladoras (células T_{reg}), anteriormente conocidas como células T supresoras, resultan cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria. Su función principal es cerrar la inmunidad mediada por células T hacia el final de la reacción inmunitaria y suprimir las células T autorreactivas que escapan al proceso de selección negativa en el timo.

Se han descrito dos clases principales de células T_{reg} CD4⁺: las células T_{reg} naturales y las células T_{reg} adaptativas.

Las células T_{reg} naturales (también conocidas como células T_{reg} CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) aparecen en el timo y se han relacionado con interacciones entre las células T en desarrollo y las células dendríticas tanto mieloides (CD11c⁺) como plasmacitoides (CD123⁺) que han sido activadas con TSLP. Las células T_{reg} naturales pueden distinguirse de otras células T por la presencia de una molécula intracelular denominada FoxP3. Las mutaciones del gen de FOXP3 pueden evitar el desarrollo de células T reguladoras, causando la enfermedad autoinmunitaria fatal IPEX.

Las células T_{reg} adaptativas (también conocidas como células Tr1 o células Th3) pueden originarse durante una respuesta inmunitaria normal.

Las células asesinas naturales (o células NK) son un tipo de células citolíticas que forman parte del sistema inmunitario innato. Las células NK proporcionan respuestas rápidas a las señales innatas de células infectadas víricamente de una manera independiente del CMH.

Las células NK (pertenecientes al grupo de las células linfoides innatas) se definen como linfocitos granulares grandes (LGG) y constituyen el tercer tipo de células diferenciadas a partir del progenitor linfoide común que genera linfocitos B y T. Es conocido que las células NK se diferencian y maduran en la médula ósea, ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y timo, en donde a continuación entran en la circulación.

Las células de la invención pueden ser cualquiera de los tipos celulares indicados anteriormente.

Las células T o NK que expresan las moléculas de la invención pueden crearse ex vivo a partir de la propia sangre periférica de un paciente (1^o parte) o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas procedentes de la sangre periférica de un donante (2^o parte) o de sangre periférica procedente de un donante no relacionado (3^o parte).

Alternativamente, las células T o NK que expresan las moléculas de la invención pueden derivarse de la diferenciación ex vivo de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias en células T. Alternativamente, puede utilizarse una línea de células T inmortalizadas que conservan su función lítica y podrían actuar como un terapéutico.

En la totalidad de dichas realizaciones, las células se generan mediante la introducción de ADN o ARN codificante del componente receptor y del componente de señalización por uno de entre varios medios, incluyendo la transducción con un vector vírico, o la transfección con ADN o ARN.

Las células de la invención puede ser una célula T o NK ex vivo procedente de un sujeto. La célula T o NK puede proceder 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 de la invención, por ejemplo mediante tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD3.

La célula T o NK de la invención puede prepararse mediante:

- (i) aislamiento de una muestra que contiene células T o NK de un sujeto o de otras fuentes indicadas anteriormente, y
- (ii) transducción o transfección de las células T o NK con una o más secuencias de ácidos nucleicos según la invención.

A continuación, las células T o NK pueden purificarse, por ejemplo, seleccionarse basándose en la expresión del dominio de unión a antígeno del polipéptido de unión a antígeno.

La presente invención proporciona además una célula que comprende una proteína truncada de la invención y un receptor de antígeno quimérico (RAQ).

El receptor de antígeno quimérico (RAQ) puede ser un RAQ activador que comprende un endodominio que contiene ITAM, tal como CD3 zeta. El RAQ puede ser un RAQ inhibitorio que comprende un endodominio de "apagado de ligación", tal como se indica en el documento nº WO2015/075469, que puede comprender la totalidad o parte del endodominio de una tirosina fosfatasa de tipo receptor, tal como CD148 o CD45. El RAQ puede ser un RAQ inhibitorio que comprende un endodominio de "apagado de ligación", tal como se indica en el documento nº WO2015/075470, que puede comprender un dominio ITIM.

Las proteínas truncadas de la invención pueden utilizarse junto con una célula que expresa una combinación de "puerta lógica" de dos o más RAQ. Una puerta O comprende dos RAQ activadores tal como se indica en el documento nº WO2015/075468. Una puerta Y comprende un RAQ activador y un RAQ inhibitorio de "apagado de ligación" tal como se indica en el documento nº WO2015/075469. Y la puerta Y comprende un RAQ activador y un RAQ inhibitorio de "apagado de ligación" tal como se indica en el documento nº WO2015/075470.

De esta manera, la presente invención proporciona una célula que comprende:

- (i) una secuencia de ácido nucleico codificante de una proteína truncada de la invención,
- (ii) un primer receptor de antígeno quimérico (RAQ), y
- (iii) un segundo receptor de antígeno quimérico.

En referencia al aspecto de señal de transcripción de la exposición, se proporciona una célula que comprende: (i) una proteína de fusión que comprende un dominio SH2 y un dominio de proteasa, y (ii) un factor de transcripción anclado a membrana que comprende: un anclaje a membrana, un sitio de reconocimiento de proteasa y un factor de transcripción.

En referencia al aspecto de señal de castración de la exposición, se proporciona una célula que comprende: (i) una proteína de fusión que comprende un dominio SH2 y un dominio de proteasa y (ii) un receptor que comprende un sitio de corte de proteasa.

El receptor puede ser, por ejemplo, un receptor de células T (RCT) o un receptor de antígeno quimérico (RAQ), que comprende: (i) un sitio de corte de proteasa entre un dominio transmembranal y un endodominio activador, o (ii) un endodominio activador fusionado con un endodominio inhibitorio mediante un sitio de corte de proteasa.

COMPOSICIÓN

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células de la invención. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Dicha formulación puede encontrarse, por ejemplo, en una forma adecuada para la infusión intravenosa.

MÉTODO DE TRATAMIENTO

Las células de la presente invención pueden ser capaces de eliminar células diana, tales como células de cáncer.

Las células de la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento de una infección, tal como una infección vírica.

Las células de la invención pueden utilizarse además para el control de respuestas inmunitarias patogénicas, por ejemplo, en enfermedades autoinmunitarias, alergias y rechazo del injerto contra el huésped.

Las células de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de una enfermedad cancerosa, tal como el cáncer de vejiga, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer endometrial, el cáncer renal (células renales), la leucemia, el cáncer de pulmón, el melanoma, el linfoma no de Hodgkin, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata y el cáncer de tiroides.

Las células de la invención pueden utilizarse para tratar: cánceres de la cavidad oral y la faringe, que incluye cáncer de lengua, boca y faringe; cánceres del sistema digestivo, que incluye los cánceres esofágico, gástrico y colorrectal; cánceres de hígado y el árbol biliar, que incluye carcinomas hepatocelulares y colangiocarcinomas; cánceres del sistema respiratorio, que incluye cánceres broncogénicos y cánceres de laringe; cánceres de hueso y articulaciones, que incluye osteosarcoma; cánceres de piel, que incluye melanoma; cáncer de mama; cánceres del tracto genital, que incluye cáncer uterino, ovárico y cervical en mujeres; cáncer de próstata y testicular en hombres; cánceres del tracto renal, que incluye carcinoma de células renales y carcinomas de células transicionales de los uréteres o la vejiga; cánceres de cerebro, incluyendo gliomas, glioblastoma multiforme y meduloblastomas; cánceres del sistema endocrino, incluyendo cáncer de tiroides, carcinoma adrenal y cánceres asociados a múltiples síndromes de neoplasma endocrino; linfomas, incluyendo el linfoma de Hodgkin y linfoma no de Hodgkin; mieloma múltiple y plasmacitomas; leucemias tanto agudas como crónicas, mieloide o linfóide; y cánceres de otros sitios no especificados, incluyendo el neuroblastoma.

El tratamiento con las células de la invención puede ayudar a evitar la fuga o liberación de células tumorales que se produce con frecuencia con los enfoques estándares.

A continuación, se describe adicionalmente la invención mediante ejemplos, que pretenden servir para ayudar al experto ordinario en la materia a llevar a cabo la invención y no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Sometimiento de la ruta de activación de las células T a señales aumentadas o no fisiológicas

Se sometieron a ensayo varios dominios SH2 que participan en la activación temprana de señales de células T a fin de determinar si las señales de activación de células T podían someterse o "secuestrarse", de manera que, al activar una célula T, la señal pudiese modularse o retransmitirse.

Los inventores generaron varios constructos quiméricos de AKT mediante la unión del dominio de quinasa de Akt a dominios SH2 de Zap70, Grap, Grb2 y PLCγ (figura 8).

En células T no transducidas (NT), se detectaban niveles muy bajos de fosforilación de la AKT endógena tras el tratamiento con OKT3 para inducir el entrecruzamiento y activación del RCT (figura 10b: panel superior). Sin embargo, en células que expresaban el constructo Zap-AKT, se observaron niveles significativos de fosfo-AKT (figura 10b: panel inferior).

El conector para la activación de las células T (LAT) es una diana corriente abajo de ZAP70 y se une a varias proteínas que contienen SH2, tales como Grb2, Grap y PLCγ. Se anticipó que los dominios SH2 de cada una de dichos ligantes LAT también permitiría secuestrar la señal de activación de CD3-zeta. Sin embargo, éste no fue el caso.

No se observó fosforilación dependiente de RCT del dominio de quinasa AKT a niveles superiores a los observados para las células T NT al unir el dominio de quinasa AKT a los dominios SH2 de Grb2, Grap o PLCγ (figura 9a).

Lo anterior demuestra que dicho sistema de secuestro de la señalización de las células T requiere específicamente el dominio SH2 en tándem de una molécula de señalización de células T muy temprana, tal como Zap70 o proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 6 (PTPN6).

Ejemplo 2. Control transcripcional

La proteasa de TeV se fusionó con el dominio SH2 de Zap70. También se generó un factor de transcripción unido a membrana, de la manera siguiente: Se clonó RQR8 en el mismo marco del factor de transcripción VP16/GAL4 separado por un sitio de corte de TeV. Dicha proteína de fusión permite la liberación del factor de transcripción VP16/GAL4 (que contiene una señal de localización nuclear) tras el corte del TeV.

Dichas proteínas se expresaron en una célula T que también expresa un receptor de antígeno quimérico específico de CD19. Para demostrar que resulta necesario el enfoque de ZAP70-TeV, se coexpresó el factor de transcripción con un RAQ CD19 cuyo endodominio fue sustituido por TeV (figura 11).

Las células T se expusieron a dianas negativas y positivas para CD19. Se midió la activación transcripcional mediante un casete de luciferasa que responde a GALv/VP16. Sólo la condición en que se coexpresaba un RAQ CD19 estándar

con ZAP-TeV y el factor de transcripción anclado a membrana resultó en la activación transcripcional selectiva con el reconocimiento de CD19. El RAQ CD19 fusionado directamente con el TeV resultó en activación transcripcional constitutiva (figura 12).

5 Ejemplo 3. Bloqueo de la señal de PD-1 utilizando SHP-1 truncado (PTPN6) o SHP-2 truncado

Se transdujeron células PBMC tal como se muestra en la tabla a continuación:

Nombre en leyenda de la figura 15	Descripción	Construido(s)
NT	No transducido	-
FMC63	Transducido con RAQ de CD19 únicamente	SFG.aCD19_fmc63-HCH2CH3w-CD28tmZw
PD1	Transducido con PD1 únicamente	pDual-PD1-GFP
FMC63+PD1	Cotransducido con RAQCD19 y PD1	SFG.aCD19_fmc63-HCH2CH3w-CD28tmZw y pDual-PD1-GFP
FMC63-SHP1+PD1	Cotransducido con a) constructo bicistrónico codificante de RAQ CD19 y SHP1 truncado, y b) PD1	SFG.aCD19_fmc63-HCH2CH3w-CD28tm-Zeta_w-2A-dualSH2_SHP-1 y pDual-PD1-GFP
FMC63-SHP2+PD1	Cotransducido con a) constructo bicistrónico codificante de RAQ CD19 y SHP1 truncado, y b) PD1	SFG.aCD19_fmc63-HCH2CH3w-CD28tm-Zeta_w-2A-dualSH2_SHP-2 y pDual-PD1-GFP

- 10 Las células se cocultivaron durante 48 horas con células SupT1 transducidas con CD19, PDL1 o ambas y se midió la liberación de IFN γ mediante ELISA. Se muestran los resultados en la figura 15.

La presencia de PDL1 sobre las células diana SupT1 causó una reducción de la liberación de IFN γ . Se produjo una liberación incrementada de IFN γ con las PBMC que expresaban RAQ junto con el constructo de SHP-1 truncado o

15 SHP-2 truncado en comparación con las que expresaban RAQ solo. Lo anterior indica que los constructos de SHP-1 y SHP-2 truncado inhibían con éxito la señal inhibitoria de PDL1 de las células diana.

Ejemplo 4 - secuestro de la señal de PD-1 utilizando una fusión de dominios SH2 de SHP-2 y quinasa Zap70

- 20 Se transdujeron células PBMC tal como se muestra en la tabla a continuación:

Nombre en leyenda de la figura 16	Descripción	Construido(s)
NT	No transducido	-
FMC63	Transducido con RAQ de CD19 únicamente	SFG.aCD19_fmc63-HCH2CH3w-CD28tmZw
PD1	Transducido con PD1 únicamente	pDual-PD1-GFP
FMC63+PD1	Cotransducido con RAQCD19 y PD1	SFG.aCD19_fmc63-HCH2CH3w-CD28tmZw y pDual-PD1-GFP
FMC63-SHP2Zap70+PD1	Cotransducido con a) constructo bicistrónico codificante de RAQ CD19 y fusión de dominios SH2 de SHP2 y quinasa Zap70, y b) PD1	SFG.aCD19_fmc63-HCH2CH3w-CD28tm-Zeta_w-2A-dualSH2_SHP-2-Zap70_quinasa y pDual-PD1-GFP

- 25 Dichas células se cocultivaron en una proporción 1:1 durante 24 horas con células SupT1 transducidas con CD19 o PDL1. Se midió la liberación de IFN γ mediante ELISA (figura 16A). Se observó un incremento de producción de IFN γ y en los cocultivos de RAQ-SHP2.Zap70 + células T transducidas con PD1 con células diana SupT1 PDL1 en comparación con células T transducidas con RAQ + PD1.

- 30 También se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad en el que se cuantificó la eliminación de las células SupT1 mediante FACS (figura 16B). Se observó una eliminación prácticamente completa de las dianas SupT1 PDL1 en cocultivos de células diana positivas para PDL1 con células T transducidas con RAQ-SHP2.Zap70 + PD1. En contraste, no se observó eliminación con el constructo de RAQ + PD1 solo. Lo anterior indica que la sustitución del dominio de fosfatasa de SHP2 por el dominio de quinasa de Zap70 convierte con éxito la señal de PD1 inhibitoria en una señal de activación. Por lo tanto, la proteína de fusión SHP-2-quinasa Zap70 secuestra con éxito la señal de PDL1-PD1 inhibitoria y la convierte en una señal de activación de las células T.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCL Business PLC

<120> Cell

<130> P106294PCT

5 <150> GB 1509413.9

<151> 2015-06-01

<160> 63

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 619

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser
1 5 10 15

Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly
20 25 30

Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu
35 40 45

Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His His Phe Pro Ile Glu Arg Gln
50 55 60

Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly Gly Lys Ala His Cys Gly Pro
65 70 75 80

Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys
85 90 95

Asn Leu Arg Lys Pro Cys Asn Arg Pro Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro
100 105 110

Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
115 120 125

Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
130 135 140

Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
145 150 155 160

Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys

20

ES 2 791 338 T3

165										170					175				
Leu	Tyr	Ser	Gly 180	Ala	Gln	Thr	Asp	Gly 185	Lys	Phe	Leu	Leu	Arg 190	Pro	Arg				
Lys	Glu	Gln 195	Gly	Thr	Tyr	Ala	Leu 200	Ser	Leu	Ile	Tyr	Gly 205	Lys	Thr	Val				
Tyr	His 210	Tyr	Leu	Ile	Ser	Gln 215	Asp	Lys	Ala	Gly	Lys 220	Tyr	Cys	Ile	Pro				
Glu 225	Gly	Thr	Lys	Phe	Asp 230	Thr	Leu	Trp	Gln	Leu 235	Val	Glu	Tyr	Leu	Lys 240				
Leu	Lys	Ala	Asp	Gly 245	Leu	Ile	Tyr	Cys	Leu 250	Lys	Glu	Ala	Cys	Pro 255	Asn				
Ser	Ser	Ala	Ser 260	Asn	Ala	Ser	Gly	Ala 265	Ala	Ala	Pro	Thr	Leu 270	Pro	Ala				
His	Pro	Ser 275	Thr	Leu	Thr	His	Pro 280	Gln	Arg	Arg	Ile	Asp 285	Thr	Leu	Asn				
Ser	Asp 290	Gly	Tyr	Thr	Pro	Glu 295	Pro	Ala	Arg	Ile	Thr 300	Ser	Pro	Asp	Lys				
Pro 305	Arg	Pro	Met	Pro	Met 310	Asp	Thr	Ser	Val	Tyr 315	Glu	Ser	Pro	Tyr	Ser 320				
Asp	Pro	Glu	Glu	Leu 325	Lys	Asp	Lys	Lys	Leu 330	Phe	Leu	Lys	Arg	Asp 335	Asn				
Leu	Leu	Ile	Ala 340	Asp	Ile	Glu	Leu	Gly 345	Cys	Gly	Asn	Phe	Gly 350	Ser	Val				
Arg	Gln	Gly 355	Val	Tyr	Arg	Met	Arg 360	Lys	Lys	Gln	Ile	Asp 365	Val	Ala	Ile				
Lys	Val 370	Leu	Lys	Gln	Gly	Thr 375	Glu	Lys	Ala	Asp	Thr 380	Glu	Glu	Met	Met				
Arg 385	Glu	Ala	Gln	Ile	Met 390	His	Gln	Leu	Asp	Asn 395	Pro	Tyr	Ile	Val	Arg 400				
Leu	Ile	Gly	Val	Cys 405	Gln	Ala	Glu	Ala	Leu 410	Met	Leu	Val	Met	Glu 415	Met				

ES 2 791 338 T3

Ala Gly Gly Gly Pro Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu
420 425 430

Ile Pro Val Ser Asn Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly
435 440 445

Met Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala
450 455 460

Arg Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe
465 470 475 480

Gly Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg
485 490 495

Ser Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn
500 505 510

Phe Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr
515 520 525

Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys
530 535 540

Gly Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys
545 550 555 560

Pro Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp
565 570 575

Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg
580 585 590

Met Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro
595 600 605

Gly Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala
610 615

<210> 2

<211> 280

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio SH2 completo de ZAP70

<400> 2

Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser

ES 2 791 338 T3

1	5	10	15
Arg Ala Glu	Ala Glu Glu	His Leu Lys	Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly
	20	25	30
Leu Phe Leu	Leu Arg Gln	Cys Leu Arg	Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu
	35	40	45
Ser Leu Val	His Asp Val	Arg Phe His	His Phe Pro Ile Glu Arg Gln
	50	55	60
Leu Asn Gly	Thr Tyr Ala	Ile Ala Gly	Gly Lys Ala His Cys Gly Pro
65	70	75	80
Ala Glu Leu	Cys Glu Phe	Tyr Ser Arg	Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys
	85	90	95
Asn Leu Arg	Lys Pro Cys	Asn Arg Pro	Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro
	100	105	110
Gly Val Phe	Asp Cys Leu	Arg Asp Ala	Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
	115	120	125
Gln Thr Trp	Lys Leu Glu	Gly Glu Ala	Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
	130	135	140
Gln Ala Pro	Gln Val Glu	Lys Leu Ile	Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
145	150	155	160
Met Pro Trp	Tyr His Ser	Ser Leu Thr	Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
	165	170	175
Leu Tyr Ser	Gly Ala Gln	Thr Asp Gly	Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
	180	185	190
Lys Glu Gln	Gly Thr Tyr	Ala Leu Ser	Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
	195	200	205
Tyr His Tyr	Leu Ile Ser	Gln Asp Lys	Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro
	210	215	220
Glu Gly Thr	Lys Phe Asp	Thr Leu Trp	Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys
225	230	235	240
Leu Lys Ala	Asp Gly Leu	Ile Tyr Cys	Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
	245	250	255
Ser Ser Ala	Ser Asn Ala	Ser Gly Ala	Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
	260	265	270
His Pro Ser	Thr Leu Thr	His Pro	
	275	280	

5 <210> 3
<211> 93

ES 2 791 338 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ZAP70 SH2 1

<400> 3

Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg
20 25 30

Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His
35 40 45

His Phe Pro Ile Glu Arg Gln Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly
50 55 60

Gly Lys Ala His Cys Gly Pro Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg
65 70 75 80

Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys Asn Leu Arg Lys Pro Cys
85 90

<210> 4

<211> 92

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ZAP70 SH2 2

<400> 4

Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys Leu Tyr
1 5 10 15

Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg Lys Glu
20 25 30

Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val Tyr His
35 40 45

Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro Glu Gly
50 55 60

Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys Leu Lys
65 70 75 80

Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys
85 90

<210> 5

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 791 338 T3

Met	Val	Arg	Trp	Phe	His	Arg	Asp	Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Ala	Glu	Thr	1	5	10	15
Leu	Leu	Lys	Gly	Arg	Gly	Val	His	Gly	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg	Pro	Ser	20	25	30	
Arg	Lys	Asn	Gln	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Ser	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Gln	35	40	45	
Val	Thr	His	Ile	Arg	Ile	Gln	Asn	Ser	Gly	Asp	Phe	Tyr	Asp	Leu	Tyr	50	55	60	
Gly	Gly	Glu	Lys	Phe	Ala	Thr	Leu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Tyr	Tyr	Thr	65	70	75	80
Gln	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Gln	Asp	Arg	Asp	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Leu	85	90	95	
Lys	Tyr	Pro	Leu	Asn	Cys	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Glu	Arg	Trp	Tyr	His	100	105	110	
Gly	His	Met	Ser	Gly	Gly	Gln	Ala	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Gly	115	120	125	
Glu	Pro	Trp	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Glu	Ser	Leu	Ser	Gln	Pro	Gly	Asp	130	135	140	
Phe	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Asp	Gln	Pro	Lys	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	145	150	155	160
Pro	Leu	Arg	Val	Thr	His	Ile	Lys	Val	Met	Cys	Glu	Gly	Gly	Arg	Tyr	165	170	175	

ES 2 791 338 T3

Thr Val Gly Gly Leu Glu Thr Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu
 180 185 190

His Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Glu Ala Ser Gly Ala Phe Val Tyr
 195 200 205

Leu Arg Gln Pro Tyr Tyr Ala Thr Arg Val Asn Ala Ala Asp Ile Glu
 210 215 220

Asn Arg Val Leu Glu Leu Asn Lys Lys Gln Glu Ser Glu Asp Thr Ala
 225 230 235 240

Lys Ala Gly Phe Trp Glu Glu Phe Glu Ser Leu Gln Lys Gln Glu Val
 245 250 255

Lys Asn Leu His Gln Arg Leu Glu Gly Gln Arg Pro Glu Asn Lys Gly
 260 265 270

Lys Asn Arg Tyr Lys Asn Ile Leu Pro Phe Asp His Ser Arg Val Ile
 275 280 285

Leu Gln Gly Arg Asp Ser Asn Ile Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala
 290 295 300

Asn Tyr Ile Lys Asn Gln Leu Leu Gly Pro Asp Glu Asn Ala Lys Thr
 305 310 315 320

Tyr Ile Ala Ser Gln Gly Cys Leu Glu Ala Thr Val Asn Asp Phe Trp
 325 330 335

Gln Met Ala Trp Gln Glu Asn Ser Arg Val Ile Val Met Thr Thr Arg
 340 345 350

Glu Val Glu Lys Gly Arg Asn Lys Cys Val Pro Tyr Trp Pro Glu Val
 355 360 365

Gly Met Gln Arg Ala Tyr Gly Pro Tyr Ser Val Thr Asn Cys Gly Glu
 370 375 380

His Asp Thr Thr Glu Tyr Lys Leu Arg Thr Leu Gln Val Ser Pro Leu
 385 390 395 400

Asp Asn Gly Asp Leu Ile Arg Glu Ile Trp His Tyr Gln Tyr Leu Ser
 405 410 415

Trp Pro Asp His Gly Val Pro Ser Glu Pro Gly Gly Val Leu Ser Phe
 420 425 430

ES 2 791 338 T3

Leu Asp Gln Ile Asn Gln Arg Gln Glu Ser Leu Pro His Ala Gly Pro
435 440 445

Ile Ile Val His Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Thr Ile Ile
450 455 460

Val Ile Asp Met Leu Met Glu Asn Ile Ser Thr Lys Gly Leu Asp Cys
465 470 475 480

Asp Ile Asp Ile Gln Lys Thr Ile Gln Met Val Arg Ala Gln Arg Ser
485 490 495

Gly Met Val Gln Thr Glu Ala Gln Tyr Lys Phe Ile Tyr Val Ala Ile
500 505 510

Ala Gln Phe Ile Glu Thr Thr Lys Lys Lys Leu Glu Val Leu Gln Ser
515 520 525

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

Met Lys Asn Ala His Ala Lys Ala Ser Arg Thr Ser Ser Lys His Lys
545 550 555 560

Glu Asp Val Tyr Glu Asn Leu His Thr Lys Asn Lys Arg Glu Glu Lys
565 570 575

Val Lys Lys Gln Arg Ser Ala Asp Lys Glu Lys Ser Lys Gly Ser Leu
580 585 590

Lys Arg Lys
595

<210> 6

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio complete SH2 de PTPN6

<400> 6

Met Val Arg Trp Phe His Arg Asp Leu Ser Gly Leu Asp Ala Glu Thr
1 5 10 15

Leu Leu Lys Gly Arg Gly Val His Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser
20 25 30

ES 2 791 338 T3

Arg Lys Asn Gln Gly Asp Phe Ser Leu Ser Val Arg Val Gly Asp Gln
35 40 45

Val Thr His Ile Arg Ile Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60

Gly Gly Glu Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu Leu Val Glu Tyr Tyr Thr
65 70 75 80

Gln Gln Gln Gly Val Leu Gln Asp Arg Asp Gly Thr Ile Ile His Leu
85 90 95

Lys Tyr Pro Leu Asn Cys Ser Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp Tyr His
100 105 110

Gly His Met Ser Gly Gly Gln Ala Glu Thr Leu Leu Gln Ala Lys Gly
115 120 125

Glu Pro Trp Thr Phe Leu Val Arg Glu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Asp
130 135 140

Phe Val Leu Ser Val Leu Ser Asp Gln Pro Lys Ala Gly Pro Gly Ser
145 150 155 160

Pro Leu Arg Val Thr His Ile Lys Val Met Cys Glu Gly Gly Arg Tyr
165 170 175

Thr Val Gly Gly Leu Glu Thr Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu
180 185 190

His Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Glu Ala Ser Gly Ala Phe Val Tyr
195 200 205

Leu Arg Gln Pro Tyr Tyr
210

<210> 7
<211> 97
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PTPN6 SH2 1

<400> 7

Trp Phe His Arg Asp Leu Ser Gly Leu Asp Ala Glu Thr Leu Leu Lys
1 5 10 15

ES 2 791 338 T3

Gly Arg Gly Val His Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser Arg Lys Asn
20 25 30

Gln Gly Asp Phe Ser Leu Ser Val Arg Val Gly Asp Gln Val Thr His
35 40 45

Ile Arg Ile Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr Gly Gly Glu
50 55 60

Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu Leu Val Glu Tyr Tyr Thr Gln Gln Gln
65 70 75 80

Gly Val Leu Gln Asp Arg Asp Gly Thr Ile Ile His Leu Lys Tyr Pro
85 90 95

Leu

<210> 8
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PTPN6 SH2 2

<400> 8

Trp Tyr His Gly His Met Ser Gly Gly Gln Ala Glu Thr Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ala Lys Gly Glu Pro Trp Thr Phe Leu Val Arg Glu Ser Leu Ser Gln
20 25 30

Pro Gly Asp Phe Val Leu Ser Val Leu Ser Asp Gln Pro Lys Ala Gly
35 40 45

Pro Gly Ser Pro Leu Arg Val Thr His Ile Lys Val Met Cys Glu Gly
50 55 60

Gly Arg Tyr Thr Val Gly Gly Leu Glu Thr Phe Asp Ser Leu Thr Asp
65 70 75 80

Leu Val Glu His Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Glu Ala Ser Gly Ala
85 90 95

Phe Val Tyr Leu Arg Gln Pro Tyr
100

<210> 9
<211> 597
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9

ES 2 791 338 T3

Met Thr Ser Arg Arg Trp Phe His Pro Asn Ile Thr Gly Val Glu Ala
 1 5 10 15
 Glu Asn Leu Leu Leu Thr Arg Gly Val Asp Gly Ser Phe Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Ser Lys Ser Asn Pro Gly Asp Phe Thr Leu Ser Val Arg Arg Asn
 35 40 45
 Gly Ala Val Thr His Ile Lys Ile Gln Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Asp
 50 55 60
 Leu Tyr Gly Gly Glu Lys Phe Ala Thr Leu Ala Glu Leu Val Gln Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Met Glu His His Gly Gln Leu Lys Glu Lys Asn Gly Asp Val Ile
 85 90 95
 Glu Leu Lys Tyr Pro Leu Asn Cys Ala Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp
 100 105 110
 Phe His Gly His Leu Ser Gly Lys Glu Ala Glu Lys Leu Leu Thr Glu
 115 120 125
 Lys Gly Lys His Gly Ser Phe Leu Val Arg Glu Ser Gln Ser His Pro
 130 135 140
 Gly Asp Phe Val Leu Ser Val Arg Thr Gly Asp Asp Lys Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Asn Asp Gly Lys Ser Lys Val Thr His Val Met Ile Arg Cys Gln Glu
 165 170 175
 Leu Lys Tyr Asp Val Gly Gly Gly Glu Arg Phe Asp Ser Leu Thr Asp
 180 185 190
 Leu Val Glu His Tyr Lys Lys Asn Pro Met Val Glu Thr Leu Gly Thr
 195 200 205
 Val Leu Gln Leu Lys Gln Pro Leu Asn Thr Thr Arg Ile Asn Ala Ala
 210 215 220
 Glu Ile Glu Ser Arg Val Arg Glu Leu Ser Lys Leu Ala Glu Thr Thr

ES 2 791 338 T3

225		230		235		240
Asp Lys Val Lys Gln Gly Phe Trp Glu Glu Phe Glu Thr Leu Gln Gln						
		245		250		255
Gln Glu Cys Lys Leu Leu Tyr Ser Arg Lys Glu Gly Gln Arg Gln Glu						
		260		265		270
Asn Lys Asn Lys Asn Arg Tyr Lys Asn Ile Leu Pro Phe Asp His Thr						
		275		280		285
Arg Val Val Leu His Asp Gly Asp Pro Asn Glu Pro Val Ser Asp Tyr						
		290		295		300
Ile Asn Ala Asn Ile Ile Met Pro Glu Phe Glu Thr Lys Cys Asn Asn						
305		310		315		320
Ser Lys Pro Lys Lys Ser Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Cys Leu Gln Asn						
		325		330		335
Thr Val Asn Asp Phe Trp Arg Met Val Phe Gln Glu Asn Ser Arg Val						
		340		345		350
Ile Val Met Thr Thr Lys Glu Val Glu Arg Gly Lys Ser Lys Cys Val						
		355		360		365
Lys Tyr Trp Pro Asp Glu Tyr Ala Leu Lys Glu Tyr Gly Val Met Arg						
		370		375		380
Val Arg Asn Val Lys Glu Ser Ala Ala His Asp Tyr Thr Leu Arg Glu						
385		390		395		400
Leu Lys Leu Ser Lys Val Gly Gln Ala Leu Leu Gln Gly Asn Thr Glu						
		405		410		415
Arg Thr Val Trp Gln Tyr His Phe Arg Thr Trp Pro Asp His Gly Val						
		420		425		430
Pro Ser Asp Pro Gly Gly Val Leu Asp Phe Leu Glu Glu Val His His						
		435		440		445
Lys Gln Glu Ser Ile Val Asp Ala Gly Pro Val Val Val His Cys Ser						
		450		455		460
Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Thr Phe Ile Val Ile Asp Ile Leu Ile						
465		470		475		480

ES 2 791 338 T3

Asp Ile Ile Arg Glu Lys Gly Val Asp Cys Asp Ile Asp Val Pro Lys
485 490 495

Thr Ile Gln Met Val Arg Ser Gln Arg Ser Gly Met Val Gln Thr Glu
500 505 510

Ala Gln Tyr Arg Phe Ile Tyr Met Ala Val Gln His Tyr Ile Glu Thr
515 520 525

Leu Gln Arg Arg Ile Glu Glu Glu Gln Lys Ser Lys Arg Lys Gly His
530 535 540

Glu Tyr Thr Asn Ile Lys Tyr Ser Leu Val Asp Gln Thr Ser Gly Asp
545 550 555 560

Gln Ser Pro Leu Pro Pro Cys Thr Pro Thr Pro Pro Cys Ala Glu Met
565 570 575

Arg Glu Asp Ser Ala Arg Val Tyr Glu Asn Val Gly Leu Met Gln Gln
580 585 590

Gln Arg Ser Phe Arg
595

<210> 10

<211> 97

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> primer dominio SH2 de SHP-2

<400> 10

Trp Phe His Pro Asn Ile Thr Gly Val Glu Ala Glu Asn Leu Leu Leu
1 5 10 15

Thr Arg Gly Val Asp Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser Lys Ser Asn
20 25 30

Pro Gly Asp Phe Thr Leu Ser Val Arg Arg Asn Gly Ala Val Thr His
35 40 45

Ile Lys Ile Gln Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Asp Leu Tyr Gly Gly Glu
50 55 60

Lys Phe Ala Thr Leu Ala Glu Leu Val Gln Tyr Tyr Met Glu His His
65 70 75 80

Gly Gln Leu Lys Glu Lys Asn Gly Asp Val Ile Glu Leu Lys Tyr Pro

85

90

95

Leu

<210> 11

<211> 105

ES 2 791 338 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> segundo dominio SH2 de SHP-2

<400> 11

Trp Phe His Gly His Leu Ser Gly Lys Glu Ala Glu Lys Leu Leu Thr
1 5 10 15

Glu Lys Gly Lys His Gly Ser Phe Leu Val Arg Glu Ser Gln Ser His
20 25 30

Pro Gly Asp Phe Val Leu Ser Val Arg Thr Gly Asp Asp Lys Gly Glu
35 40 45

Ser Asn Asp Gly Lys Ser Lys Val Thr His Val Met Ile Arg Cys Gln
50 55 60

Glu Leu Lys Tyr Asp Val Gly Gly Gly Glu Arg Phe Asp Ser Leu Thr
65 70 75 80

Asp Leu Val Glu His Tyr Lys Lys Asn Pro Met Val Glu Thr Leu Gly
85 90 95

Thr Val Leu Gln Leu Lys Gln Pro Leu
100 105

10

<210> 12

<211> 211

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> ambos dominios SH2 de SHP-2

<400> 12

20

Trp Phe His Pro Asn Ile Thr Gly Val Glu Ala Glu Asn Leu Leu Leu
1 5 10 15

Thr Arg Gly Val Asp Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser Lys Ser Asn
20 25 30

ES 2 791 338 T3

Pro Gly Asp Phe Thr Leu Ser Val Arg Arg Asn Gly Ala Val Thr His
35 40 45

Ile Lys Ile Gln Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Asp Leu Tyr Gly Gly Glu
50 55 60

Lys Phe Ala Thr Leu Ala Glu Leu Val Gln Tyr Tyr Met Glu His His
65 70 75 80

Gly Gln Leu Lys Glu Lys Asn Gly Asp Val Ile Glu Leu Lys Tyr Pro
85 90 95

Leu Asn Cys Ala Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp Phe His Gly His Leu
100 105 110

Ser Gly Lys Glu Ala Glu Lys Leu Leu Thr Glu Lys Gly Lys His Gly
115 120 125

Ser Phe Leu Val Arg Glu Ser Gln Ser His Pro Gly Asp Phe Val Leu
130 135 140

Ser Val Arg Thr Gly Asp Asp Lys Gly Glu Ser Asn Asp Gly Lys Ser
145 150 155 160

Lys Val Thr His Val Met Ile Arg Cys Gln Glu Leu Lys Tyr Asp Val
165 170 175

Gly Gly Gly Glu Arg Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu His Tyr
180 185 190

Lys Lys Asn Pro Met Val Glu Thr Leu Gly Thr Val Leu Gln Leu Lys
195 200 205

Gln Pro Leu
210

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> endodominio CD3-zeta

<400> 13

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

ES 2 791 338 T3

	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		
5	<210> 14 <211> 754 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> dominio ZAP70-SH2 fusionado con un endodominio CD3-zeta <400> 14		
	Met Arg Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln 1 5 10 15		
	Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu 20 25 30		
	Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly 35 40 45		
	Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu 50 55 60		
	Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly 65 70 75 80		
	Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser 85 90 95		
	Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro 100 105 110		
15	Pro Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly 115 120 125		

ES 2 791 338 T3

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro
 130 135 140
 Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys
 145 150 155 160
 Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg
 165 170 175
 Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His
 180 185 190
 His Phe Pro Ile Glu Arg Gln Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly
 195 200 205
 Gly Lys Ala His Cys Gly Pro Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg
 210 215 220
 Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys Asn Leu Arg Lys Pro Cys Asn Arg Pro
 225 230 235 240
 Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala
 245 250 255
 Met Val Arg Asp Tyr Val Arg Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala
 260 265 270
 Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile
 275 280 285
 Ala Thr Thr Ala His Glu Arg Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr
 290 295 300
 Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly
 305 310 315 320
 Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser
 325 330 335
 Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys
 340 345 350
 Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp
 355 360 365
 Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys

ES 2 791 338 T3

370		375		380
Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala				
385		390		395
Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Gln				
	405		410	415
Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn Ser Asp Gly Tyr Thr Pro Glu Pro Ala				
	420		425	430
Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys Pro Arg Pro Met Pro Met Asp Thr Ser				
	435		440	445
Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser Asp Pro Glu Glu Leu Lys Asp Lys Lys				
	450		455	460
Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn Leu Leu Ile Ala Asp Ile Glu Leu Gly				
465		470		475
Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val Arg Gln Gly Val Tyr Arg Met Arg Lys				
	485		490	495
Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile Lys Val Leu Lys Gln Gly Thr Glu Lys				
	500		505	510
Ala Asp Thr Glu Glu Met Met Arg Glu Ala Gln Ile Met His Gln Leu				
	515		520	525
Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg Leu Ile Gly Val Cys Gln Ala Glu Ala				
	530		535	540
Leu Met Leu Val Met Glu Met Ala Gly Gly Gly Pro Leu His Lys Phe				
545		550		555
Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu Ile Pro Val Ser Asn Val Ala Glu Leu				
	565		570	575
Leu His Gln Val Ser Met Gly Met Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Asn Phe				
	580		585	590
Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His				
	595		600	605
Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp				
610		615		620

ES 2 791 338 T3

Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp
625 630 635 640

Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn Phe Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp
645 650 655

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln
660 665 670

Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys Gly Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu
675 680 685

Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys Pro Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr
690 695 700

Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp
705 710 715 720

Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg Met Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala
725 730 735

Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro Gly Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala
740 745 750

Cys Ala

<210> 15

<211> 97

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de PDCD1

<400> 15

Cys Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln
1 5 10 15

Pro Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr
20 25 30

Gly Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val
35 40 45

Pro Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser
50 55 60

Gly Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro
65 70 75 80

Arg Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro
85 90 95

Leu

<210> 16
 <211> 141
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> endodominio de BTLA4

 10 <400> 16

 Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly Leu Gln
 1 5 10 15

 Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys Val Arg
 20 25 30

 Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr Asn Pro
 35 40 45

 Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro Glu Met
 50 55 60

 Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg Pro
 65 70 75 80

 Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg
 85 90 95

 Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu
 100 105 110

 Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro
 115 120 125

 Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
 130 135 140

 15 <210> 17
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> endodominio de LILRB1

 <400> 17

ES 2 791 338 T3

Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln Arg Lys
1 5 10 15

Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro Thr Asp
20 25 30

Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln Glu Glu
35 40 45

Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp Gly Val Glu
50 55 60

Met Asp Thr Arg Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val Thr Tyr
65 70 75 80

Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Pro
85 90 95

Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln Ala Glu
100 105 110

Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln
115 120 125

Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Glu Ala
130 135 140

Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala Val Pro Ser
145 150 155 160

Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His
165

<210> 18

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de LAIR1

<400> 18

His Arg Gln Asn Gln Ile Lys Gln Gly Pro Pro Arg Ser Lys Asp Glu
1 5 10 15

Glu Gln Lys Pro Gln Gln Arg Pro Asp Leu Ala Val Asp Val Leu Glu

ES 2 791 338 T3

	20	25	30
	Arg Thr Ala Asp Lys Ala Thr Val Asn Gly Leu Pro Glu Lys Asp Arg		
	35	40	45
	Glu Thr Asp Thr Ser Ala Leu Ala Ala Gly Ser Ser Gln Glu Val Thr		
	50	55	60
	Tyr Ala Gln Leu Asp His Trp Ala Leu Thr Gln Arg Thr Ala Arg Ala		
	65	70	75
	Val Ser Pro Gln Ser Thr Lys Pro Met Ala Glu Ser Ile Thr Tyr Ala		
	85	90	95
	Ala Val Ala Arg His		
	100		
5	<210> 19		
	<211> 62		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> endodominio de CTLA4		
	<400> 19		
	Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr		
	1	5	10
	Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys Arg		
	20	25	30
	Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro		
	35	40	45
	Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn		
	50	55	60
15	<210> 20		
	<211> 111		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> endodominio de KIR2DL1		
	<400> 20		
	Gly Asn Ser Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile		
	1	5	10
			15

ES 2 791 338 T3

Ile Pro Phe Ala Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ala
20 25 30

Asn Lys Lys Asn Ala Val Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg
35 40 45

Thr Val Asn Arg Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr
50 55 60

Tyr Thr Gln Leu Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg
65 70 75 80

Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Ile Ile Val Tyr Thr
85 90 95

Glu Leu Pro Asn Ala Glu Ser Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro
100 105 110

<210> 21
<211> 143
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> endodominio de KIR2DL4

<400> 21

Gly Ile Ala Arg His Leu His Ala Val Ile Arg Tyr Ser Val Ala Ile
1 5 10 15

Ile Leu Phe Thr Ile Leu Pro Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser
20 25 30

Lys Lys Lys Glu Asn Ala Ala Val Met Asn Gln Glu Pro Ala Gly His
35 40 45

Arg Thr Val Asn Arg Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val
50 55 60

Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Ile Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr
65 70 75 80

Gly Pro Ser Gln Arg Ser Lys Arg Pro Ser Thr Asp Thr Ser Val Cys
85 90 95

Ile Glu Leu Pro Asn Ala Glu Pro Arg Ala Leu Ser Pro Ala His Glu
100 105 110

His His Ser Gln Ala Leu Met Gly Ser Ser Arg Glu Thr Thr Ala Leu
115 120 125

Ser Gln Thr Gln Leu Ala Ser Ser Asn Val Pro Ala Ala Gly Ile
130 135 140

ES 2 791 338 T3

<210> 22
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> endodominio de KIR2DL5
 <400> 22
 10
 Thr Gly Ile Arg Arg His Leu His Ile Leu Ile Gly Thr Ser Val Ala
 1 5 10 15
 Ile Ile Leu Phe Ile Ile Leu Phe Phe Phe Leu Leu His Cys Cys Cys
 20 25 30
 Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asp
 35 40 45
 Arg Thr Val Asn Arg Glu Asp Ser Asp Asp Gln Asp Pro Gln Glu Val
 50 55 60
 Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Val Phe Thr Gln Thr Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ser Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Thr Met Tyr
 85 90 95
 Met Glu Leu Pro Asn Ala Lys Pro Arg Ser Leu Ser Pro Ala His Lys
 100 105 110
 His His Ser Gln Ala Leu Arg Gly Ser Ser Arg Glu Thr Thr Ala Leu
 115 120 125
 Ser Gln Asn Arg Val Ala Ser Ser His Val Pro Ala Ala Gly Ile
 130 135 140
 <210> 23
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> endodominio de KIR3DL1
 20
 <400> 23

ES 2 791 338 T3

Lys Asp Pro Arg His Leu His Ile Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile
1 5 10 15

Ile Leu Phe Ile Leu Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Leu Trp Cys Ser
20 25 30

Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg
35 40 45

Thr Ala Asn Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Glu Glu Val Thr
50 55 60

Tyr Ala Gln Leu Asp His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg
65 70 75 80

Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Ile Leu Tyr Thr
85 90 95

Glu Leu Pro Asn Ala Lys Pro Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro
100 105 110

5
<210> 24
<211> 97
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> endodominio de KIR3DL3

<400> 24

Lys Asp Pro Gly Asn Ser Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser
1 5 10 15

Val Val Ile Ile Pro Phe Ala Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg
20 25 30

Trp Cys Ala Asn Lys Lys Asn Ala Val Val Met Asp Gln Glu Pro Ala
35 40 45

Gly Asn Arg Thr Val Asn Arg Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln
50 55 60

Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys
65 70 75 80

Ile Thr Arg Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Ser
85 90 95

15
Val

<210> 25
<211> 701
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

ES 2 791 338 T3

<220>

<223> dominio PTPN6-SH2 fusionado con un endodominio de PD1

<400> 25

5

```

Met Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe
1          5          10          15

Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro
          20          25          30

Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile
          35          40          45

Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser
50          55          60

Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His
65          70          75          80

Cys Ser Trp Pro Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
          85          90          95

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Val Arg Trp Phe His
100          105          110

Arg Asp Leu Ser Gly Leu Asp Ala Glu Thr Leu Leu Lys Gly Arg Gly
115          120          125

Val His Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser Arg Lys Asn Gln Gly Asp
130          135          140

Phe Ser Leu Ser Val Arg Val Gly Asp Gln Val Thr His Ile Arg Ile
145          150          155          160

Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr Gly Gly Glu Lys Phe Ala
165          170          175

Thr Leu Thr Glu Leu Val Glu Tyr Tyr Thr Gln Gln Gln Gly Val Leu
180          185          190

Gln Asp Arg Asp Gly Thr Ile Ile His Leu Lys Tyr Pro Leu Asn Cys
195          200          205

```

ES 2 791 338 T3

Ser Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp Tyr His Gly His Met Ser Gly Gly
 210 215 220
 Gln Ala Glu Thr Leu Leu Gln Ala Lys Gly Glu Pro Trp Thr Phe Leu
 225 230 235 240
 Val Arg Glu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Asp Phe Val Leu Ser Val Leu
 245 250 255
 Ser Asp Gln Pro Lys Ala Gly Pro Gly Ser Pro Leu Arg Val Thr His
 260 265 270
 Ile Lys Val Met Cys Glu Gly Gly Arg Tyr Thr Val Gly Gly Leu Glu
 275 280 285
 Thr Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu His Phe Lys Lys Thr Gly
 290 295 300
 Ile Glu Glu Ala Ser Gly Ala Phe Val Tyr Leu Arg Gln Pro Tyr Tyr
 305 310 315 320
 Ala Thr Arg Val Asn Ala Ala Asp Ile Glu Asn Arg Val Leu Glu Leu
 325 330 335
 Asn Lys Lys Gln Glu Ser Glu Asp Thr Ala Lys Ala Gly Phe Trp Glu
 340 345 350
 Glu Phe Glu Ser Leu Gln Lys Gln Glu Val Lys Asn Leu His Gln Arg
 355 360 365
 Leu Glu Gly Gln Arg Pro Glu Asn Lys Gly Lys Asn Arg Tyr Lys Asn
 370 375 380
 Ile Leu Pro Phe Asp His Ser Arg Val Ile Leu Gln Gly Arg Asp Ser
 385 390 395 400
 Asn Ile Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile Lys Asn Gln
 405 410 415
 Leu Leu Gly Pro Asp Glu Asn Ala Lys Thr Tyr Ile Ala Ser Gln Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Ala Thr Val Asn Asp Phe Trp Gln Met Ala Trp Gln Glu
 435 440 445
 Asn Ser Arg Val Ile Val Met Thr Thr Arg Glu Val Glu Lys Gly Arg

ES 2 791 338 T3

450		455		460
Asn Lys Cys Val Pro Tyr Trp Pro Glu Val Gly Met Gln Arg Ala Tyr				
465		470		475
Gly Pro Tyr Ser Val Thr Asn Cys Gly Glu His Asp Thr Thr Glu Tyr				
	485		490	495
Lys Leu Arg Thr Leu Gln Val Ser Pro Leu Asp Asn Gly Asp Leu Ile				
	500		505	510
Arg Glu Ile Trp His Tyr Gln Tyr Leu Ser Trp Pro Asp His Gly Val				
	515		520	525
Pro Ser Glu Pro Gly Gly Val Leu Ser Phe Leu Asp Gln Ile Asn Gln				
	530		535	540
Arg Gln Glu Ser Leu Pro His Ala Gly Pro Ile Ile Val His Cys Ser				
545		550	555	560
Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Thr Ile Ile Val Ile Asp Met Leu Met				
	565		570	575
Glu Asn Ile Ser Thr Lys Gly Leu Asp Cys Asp Ile Asp Ile Gln Lys				
	580		585	590
Thr Ile Gln Met Val Arg Ala Gln Arg Ser Gly Met Val Gln Thr Glu				
	595		600	605
Ala Gln Tyr Lys Phe Ile Tyr Val Ala Ile Ala Gln Phe Ile Glu Thr				
610		615		620
Thr Lys Lys Lys Leu Glu Val Leu Gln Ser Gln Lys Gly Gln Glu Ser				
625		630		635
Glu Tyr Gly Asn Ile Thr Tyr Pro Pro Ala Met Lys Asn Ala His Ala				
	645		650	655
Lys Ala Ser Arg Thr Ser Ser Lys His Lys Glu Asp Val Tyr Glu Asn				
	660		665	670
Leu His Thr Lys Asn Lys Arg Glu Glu Lys Val Lys Lys Gln Arg Ser				
	675		680	685
Ala Asp Lys Glu Lys Ser Lys Gly Ser Leu Lys Arg Lys				
690		695		700

<210> 26

<211> 299

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio quinasa de ZAP70

ES 2 791 338 T3

<400> 26

```

Asp Pro Glu Glu Leu Lys Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn
1          5          10          15

Leu Leu Ile Ala Asp Ile Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val
          20          25          30

Arg Gln Gly Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile
          35          40          45

Lys Val Leu Lys Gln Gly Thr Glu Lys Ala Asp Thr Glu Glu Met Met
          50          55          60

Arg Glu Ala Gln Ile Met His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg
65          70          75          80

Leu Ile Gly Val Cys Gln Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met
          85          90          95

Ala Gly Gly Gly Pro Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu
          100          105          110

Ile Pro Val Ser Asn Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly
          115          120          125

Met Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala
          130          135          140

Arg Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe
145          150          155          160

Gly Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg
          165          170          175

Ser Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn
          180          185          190

Phe Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr
          195          200          205

Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys

```

ES 2 791 338 T3

	210		215		220											
	Gly 225	Pro	Glu	Val	Met	Ala 230	Phe	Ile	Glu	Gln	Gly 235	Lys	Arg	Met	Glu	Cys 240
	Pro	Pro	Glu	Cys	Pro	Pro	Glu	Leu	Tyr	Ala 250	Leu	Met	Ser	Asp	Cys 255	Trp
	Ile	Tyr	Lys	Trp	Glu	Asp	Arg	Pro	Asp 265	Phe	Leu	Thr	Val	Glu	Gln	Arg
	Met	Arg	Ala	Cys	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Ala	Ser	Lys	Val	Glu	Gly	Pro	Pro
			275					280					285			
	Gly	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Cys	Ala					
	290						295									
5	<210>	27														
	<211>	280														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
10	<220>															
	<223>	Dominio fosfatasa de PTPN6														
	<400>	27														
	Phe	Trp	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	Gln	Glu	Val	Lys	Asn	Leu
	1				5					10					15	
	His	Gln	Arg	Leu	Glu	Gly	Gln	Arg	Pro	Glu	Asn	Lys	Gly	Lys	Asn	Arg
				20					25					30		
	Tyr	Lys	Asn	Ile	Leu	Pro	Phe	Asp	His	Ser	Arg	Val	Ile	Leu	Gln	Gly
			35					40					45			
	Arg	Asp	Ser	Asn	Ile	Pro	Gly	Ser	Asp	Tyr	Ile	Asn	Ala	Asn	Tyr	Ile
		50					55					60				
	Lys	Asn	Gln	Leu	Leu	Gly	Pro	Asp	Glu	Asn	Ala	Lys	Thr	Tyr	Ile	Ala
	65					70				75					80	
	Ser	Gln	Gly	Cys	Leu	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Asp	Phe	Trp	Gln	Met	Ala
					85					90					95	
	Trp	Gln	Glu	Asn	Ser	Arg	Val	Ile	Val	Met	Thr	Thr	Arg	Glu	Val	Glu
				100					105					110		
	Lys	Gly	Arg	Asn	Lys	Cys	Val	Pro	Tyr	Trp	Pro	Glu	Val	Gly	Met	Gln
			115					120					125			

ES 2 791 338 T3

Arg Ala Tyr Gly Pro Tyr Ser Val Thr Asn Cys Gly Glu His Asp Thr
130 135 140

Thr Glu Tyr Lys Leu Arg Thr Leu Gln Val Ser Pro Leu Asp Asn Gly
145 150 155 160

Asp Leu Ile Arg Glu Ile Trp His Tyr Gln Tyr Leu Ser Trp Pro Asp
165 170 175

His Gly Val Pro Ser Glu Pro Gly Gly Val Leu Ser Phe Leu Asp Gln
180 185 190

Ile Asn Gln Arg Gln Glu Ser Leu Pro His Ala Gly Pro Ile Ile Val
195 200 205

His Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Thr Ile Ile Val Ile Asp
210 215 220

Met Leu Met Glu Asn Ile Ser Thr Lys Gly Leu Asp Cys Asp Ile Asp
225 230 235 240

Ile Gln Lys Thr Ile Gln Met Val Arg Ala Gln Arg Ser Gly Met Val
245 250 255

Gln Thr Glu Ala Gln Tyr Lys Phe Ile Tyr Val Ala Ile Ala Gln Phe
260 265 270

Ile Glu Thr Thr Lys Lys Lys Leu
275 280

5 <210> 28
<211> 274
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Dominio fosfatasa de SHP-2

<400> 28

Trp Glu Glu Phe Glu Thr Leu Gln Gln Gln Glu Cys Lys Leu Leu Tyr
1 5 10 15

Ser Arg Lys Glu Gly Gln Arg Gln Glu Asn Lys Asn Lys Asn Arg Tyr
20 25 30

Lys Asn Ile Leu Pro Phe Asp His Thr Arg Val Val Leu His Asp Gly
35 40 45

ES 2 791 338 T3

Asp Pro Asn Glu Pro Val Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Ile Ile Met
50 55 60

Pro Glu Phe Glu Thr Lys Cys Asn Asn Ser Lys Pro Lys Lys Ser Tyr
65 70 75 80

Ile Ala Thr Gln Gly Cys Leu Gln Asn Thr Val Asn Asp Phe Trp Arg
85 90 95

Met Val Phe Gln Glu Asn Ser Arg Val Ile Val Met Thr Thr Lys Glu
100 105 110

Val Glu Arg Gly Lys Ser Lys Cys Val Lys Tyr Trp Pro Asp Glu Tyr
115 120 125

Ala Leu Lys Glu Tyr Gly Val Met Arg Val Arg Asn Val Lys Glu Ser
130 135 140

Ala Ala His Asp Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Lys Leu Ser Lys Val Gly
145 150 155 160

Gln Ala Leu Leu Gln Gly Asn Thr Glu Arg Thr Val Trp Gln Tyr His
165 170 175

Phe Arg Thr Trp Pro Asp His Gly Val Pro Ser Asp Pro Gly Gly Val
180 185 190

Leu Asp Phe Leu Glu Glu Val His His Lys Gln Glu Ser Ile Met Asp
195 200 205

Ala Gly Pro Val Val Val His Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly
210 215 220

Thr Phe Ile Val Ile Asp Ile Leu Ile Asp Ile Ile Arg Glu Lys Gly
225 230 235 240

Val Asp Cys Asp Ile Asp Val Pro Lys Thr Ile Gln Met Val Arg Ser
245 250 255

Gln Arg Ser Gly Met Val Gln Thr Glu Ala Gln Tyr Arg Phe Ile Tyr
260 265 270

Met Ala

<210> 29

<211> 519

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fusión de dominio PTPN6 SH2:dominio quinasa de ZAP70

<400> 29

ES 2 791 338 T3

Met	Val	Arg	Trp	Phe	His	Arg	Asp	Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Ala	Glu	Thr	1	5	10	15
Leu	Leu	Lys	Gly	Arg	Gly	Val	His	Gly	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg	Pro	Ser	20	25	30	
Arg	Lys	Asn	Gln	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Ser	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Gln	35	40	45	
Val	Thr	His	Ile	Arg	Ile	Gln	Asn	Ser	Gly	Asp	Phe	Tyr	Asp	Leu	Tyr	50	55	60	
Gly	Gly	Glu	Lys	Phe	Ala	Thr	Leu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Tyr	Tyr	Thr	65	70	75	80
Gln	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Gln	Asp	Arg	Asp	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Leu	85	90	95	
Lys	Tyr	Pro	Leu	Asn	Cys	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Glu	Arg	Trp	Tyr	His	100	105	110	
Gly	His	Met	Ser	Gly	Gly	Gln	Ala	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Gly	115	120	125	
Glu	Pro	Trp	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Glu	Ser	Leu	Ser	Gln	Pro	Gly	Asp	130	135	140	
Phe	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Asp	Gln	Pro	Lys	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	145	150	155	160
Pro	Leu	Arg	Val	Thr	His	Ile	Lys	Val	Met	Cys	Glu	Gly	Gly	Arg	Tyr	165	170	175	
Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Thr	Asp	Leu	Val	Glu	180	185	190	
His	Phe	Lys	Lys	Thr	Gly	Ile	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Ala	Phe	Val	Tyr	195	200	205	
Leu	Arg	Gln	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Pro	Glu	Glu	210	215	220	

ES 2 791 338 T3

Leu Lys Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn Leu Leu Ile Ala
 225 230 235 240
 Asp Ile Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val Arg Gln Gly Val
 245 250 255
 Tyr Arg Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile Lys Val Leu Lys
 260 265 270
 Gln Gly Thr Glu Lys Ala Asp Thr Glu Glu Met Met Arg Glu Ala Gln
 275 280 285
 Ile Met His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg Leu Ile Gly Val
 290 295 300
 Cys Gln Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met Ala Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Pro Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu Ile Pro Val Ser
 325 330 335
 Asn Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly Met Lys Tyr Leu
 340 345 350
 Glu Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu
 355 360 365
 Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser Lys
 370 375 380
 Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser Ala Gly Lys
 385 390 395 400
 Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn Phe Arg Lys Phe
 405 410 415
 Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Met Trp Glu Ala
 420 425 430
 Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys Gly Pro Glu Val
 435 440 445
 Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys Pro Pro Glu Cys
 450 455 460
 Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp Ile Tyr Lys Trp
 465 470 475 480
 Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg Met Arg Ala Cys
 485 490 495
 Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro Gly Ser Thr Gln
 500 505 510
 Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala
 515

ES 2 791 338 T3

<210> 30
 <211> 581
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> fusión de dominio SH2 de ZAP70:dominio fosfatasa de PTPN6

<400> 30

10

Met	Pro	Asp	Pro	Ala	Ala	His	Leu	Pro	Phe	Phe	Tyr	Gly	Ser	Ile	Ser	1	5	10	15
Arg	Ala	Glu	Ala	Glu	Glu	His	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Met	Ala	Asp	Gly	20	25	30	
Leu	Phe	Leu	Leu	Arg	Gln	Cys	Leu	Arg	Ser	Leu	Gly	Gly	Tyr	Val	Leu	35	40	45	
Ser	Leu	Val	His	Asp	Val	Arg	Phe	His	His	Phe	Pro	Ile	Glu	Arg	Gln	50	55	60	
Leu	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ala	Gly	Gly	Lys	Ala	His	Cys	Gly	Pro	65	70	75	80
Ala	Glu	Leu	Cys	Glu	Phe	Tyr	Ser	Arg	Asp	Pro	Asp	Gly	Leu	Pro	Cys	85	90	95	
Asn	Leu	Arg	Lys	Pro	Cys	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Leu	Glu	Pro	Gln	Pro	100	105	110	
Gly	Val	Phe	Asp	Cys	Leu	Arg	Asp	Ala	Met	Val	Arg	Asp	Tyr	Val	Arg	115	120	125	
Gln	Thr	Trp	Lys	Leu	Glu	Gly	Glu	Ala	Leu	Glu	Gln	Ala	Ile	Ile	Ser	130	135	140	
Gln	Ala	Pro	Gln	Val	Glu	Lys	Leu	Ile	Ala	Thr	Thr	Ala	His	Glu	Arg	145	150	155	160

ES 2 791 338 T3

Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
165 170 175

Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
180 185 190

Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
195 200 205

Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro
210 215 220

Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys
225 230 235 240

Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
245 250 255

Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
260 265 270

His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275 280 285

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Trp Glu
290 295 300

Glu Phe Glu Ser Leu Gln Lys Gln Glu Val Lys Asn Leu His Gln Arg
305 310 315 320

Leu Glu Gly Gln Arg Pro Glu Asn Lys Gly Lys Asn Arg Tyr Lys Asn
325 330 335

Ile Leu Pro Phe Asp His Ser Arg Val Ile Leu Gln Gly Arg Asp Ser
340 345 350

Asn Ile Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile Lys Asn Gln
355 360 365

Leu Leu Gly Pro Asp Glu Asn Ala Lys Thr Tyr Ile Ala Ser Gln Gly
370 375 380

Cys Leu Glu Ala Thr Val Asn Asp Phe Trp Gln Met Ala Trp Gln Glu
385 390 395 400

Asn Ser Arg Val Ile Val Met Thr Thr Arg Glu Val Glu Lys Gly Arg
405 410 415

ES 2 791 338 T3

Asn Lys Cys Val Pro Tyr Trp Pro Glu Val Gly Met Gln Arg Ala Tyr
420 425 430

Gly Pro Tyr Ser Val Thr Asn Cys Gly Glu His Asp Thr Thr Glu Tyr
435 440 445

Lys Leu Arg Thr Leu Gln Val Ser Pro Leu Asp Asn Gly Asp Leu Ile
450 455 460

Arg Glu Ile Trp His Tyr Gln Tyr Leu Ser Trp Pro Asp His Gly Val
465 470 475 480

Pro Ser Glu Pro Gly Gly Val Leu Ser Phe Leu Asp Gln Ile Asn Gln
485 490 495

Arg Gln Glu Ser Leu Pro His Ala Gly Pro Ile Ile Val His Cys Ser
500 505 510

Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Thr Ile Ile Val Ile Asp Met Leu Met
515 520 525

Glu Asn Ile Ser Thr Lys Gly Leu Asp Cys Asp Ile Asp Ile Gln Lys
530 535 540

Thr Ile Gln Met Val Arg Ala Gln Arg Ser Gly Met Val Gln Thr Glu
545 550 555 560

Ala Gln Tyr Lys Phe Ile Tyr Val Ala Ile Ala Gln Phe Ile Glu Thr
565 570 575

Thr Lys Lys Lys Leu
580

<210> 31
<211> 42
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> endodominio de CD28

<400> 31

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

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

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 32
<211> 43
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> endodominio de 41BB

ES 2 791 338 T3

<400> 32

Met Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
1 5 10 15

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
20 25 30

Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 33

<211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de OX40

<400> 33

Met Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile
35

<210> 34

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de ICOS

<400> 34

Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn
1 5 10 15

Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg
20 25 30

Leu Thr Asp Val Thr Leu
35

<210> 35

<211> 48

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de CD27

<400> 35

ES 2 791 338 T3

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys His Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
20 25 30

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
35 40 45

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de BTLA

<400> 36

Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala Gly Arg
1 5 10 15

Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln Thr Glu Ala
20 25 30

Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile Tyr
35 40 45

Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser Glu Val
50 55 60

Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val Tyr Ala
65 70 75 80

Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu Ala Arg Asn
85 90 95

Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg Ser
100 105 110

<210> 37

<211> 188

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de CD30

<400> 37

ES 2 791 338 T3

His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys
1 5 10 15

Tyr Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg
20 25 30

Pro Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu
35 40 45

Pro Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr
50 55 60

Cys His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp
65 70 75 80

Ala Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro
85 90 95

Arg Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile
100 105 110

Met Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro
115 120 125

Glu Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu
130 135 140

Leu Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro
145 150 155 160

Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly
165 170 175

Lys Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys
180 185

5 <210> 38
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> GITR endodomain

<400> 38

Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro
1 5 10 15

Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala
20 25 30

Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu
35 40 45

Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val
50 55

<210> 39

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de HYEM

<400> 39

5

Cys Val Lys Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val
1 5 10 15

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

Glu Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu
35 40 45

Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His
50 55 60

<210> 40

<211> 682

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de CD28 fusionado con extremo aminoterminal de ZAP de longitud completa

<400> 40

Met Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met

ES 2 791 338 T3

1	5	10	15
Thr	Pro	Arg	Arg
	20		
Pro	Gly	Pro	Thr
		25	
Lys	His	Tyr	Gln
		30	
Pro	Tyr	Ala	
Pro	Pro	Arg	Asp
	35		
Phe	Ala	Ala	Tyr
		40	
Arg	Ser	Ser	Gly
		45	
Gly	Gly	Gly	Gly
	50		
Ser	Gly	Gly	Gly
	55		
Ser	Gly	Gly	Gly
	60		
Gly	Ser	Met	
Pro	Asp	Pro	Ala
	65		
Ala	Ala	His	Leu
	70		
Pro	Phe	Phe	Tyr
		75	
Gly	Ser	Ile	Ser
		80	
Arg			
Ala	Glu	Ala	Glu
	85		
Glu	His	Leu	Lys
		90	
Leu	Leu	Ala	Gly
		95	
Met	Ala	Asp	Gly
		95	
Leu			
Phe	Leu	Leu	Arg
	100		
Gln	Cys	Leu	Arg
		105	
Ser	Leu	Gly	Gly
		110	
Tyr	Val	Leu	Ser
		115	
Leu	Val	His	Asp
	115		
Val	Arg	Phe	His
		120	
His	His	Phe	Pro
		125	
Ile	Glu	Arg	Gln
		125	
Leu			
Asn	Gly	Thr	Tyr
	130		
Ala	Ile	Ala	Gly
		135	
Gly	Gly	Lys	Ala
		140	
His	Cys	Gly	Pro
		145	
Ala			
Glu	Leu	Cys	Glu
	145		
Phe	Tyr	Ser	Arg
	150		
Asp	Pro	Asp	Gly
		155	
Leu	Pro	Cys	Asn
		160	
Leu	Arg	Lys	Pro
	165		
Cys	Asn	Arg	Pro
		170	
Ser	Gly	Leu	Glu
		175	
Pro	Gln	Pro	Gly
		175	
Val	Phe	Asp	Cys
	180		
Leu	Arg	Asp	Ala
		185	
Met	Val	Arg	Asp
		190	
Tyr	Val	Arg	Gln
		190	
Thr	Trp	Lys	Leu
	195		
Glu	Gly	Glu	Ala
		200	
Leu	Glu	Gln	Ala
		205	
Ile	Ile	Ser	Gln
		205	
Ala	Pro	Gln	Val
	210		
Glu	Lys	Leu	Ile
		215	
Ala	Thr	Thr	Ala
		220	
His	Glu	Arg	Met
		220	
Pro	Trp	Tyr	His
	225		
Ser	Ser	Leu	Thr
	230		
Arg	Glu	Glu	Ala
		235	
Arg	Lys	Leu	
		240	
Tyr	Ser	Gly	Ala
	245		
Gln	Thr	Asp	Gly
		250	
Lys	Phe	Leu	Leu
		255	
Arg	Pro	Arg	Lys
		255	

ES 2 791 338 T3

Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val Tyr
 260 265 270
 His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro Glu
 275 280 285
 Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys Leu
 290 295 300
 Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn Ser
 305 310 315 320
 Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala His
 325 330 335
 Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Gln Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn Ser
 340 345 350
 Asp Gly Tyr Thr Pro Glu Pro Ala Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys Pro
 355 360 365
 Arg Pro Met Pro Met Asp Thr Ser Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser Asp
 370 375 380
 Pro Glu Glu Leu Lys Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn Leu
 385 390 395 400
 Leu Ile Ala Asp Ile Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val Arg
 405 410 415
 Gln Gly Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile Lys
 420 425 430
 Val Leu Lys Gln Gly Thr Glu Lys Ala Asp Thr Glu Glu Met Met Arg
 435 440 445
 Glu Ala Gln Ile Met His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg Leu
 450 455 460
 Ile Gly Val Cys Gln Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met Ala
 465 470 475 480
 Gly Gly Gly Pro Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu Ile
 485 490 495
 Pro Val Ser Asn Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly Met
 500 505 510

ES 2 791 338 T3

Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg
515 520 525

Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe Gly
530 535 540

Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser
545 550 555 560

Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn Phe
565 570 575

Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Met
580 585 590

Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys Gly
595 600 605

Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys Pro
610 615 620

Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp Ile
625 630 635 640

Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg Met
645 650 655

Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro Gly
660 665 670

Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala
675 680

<210> 41

<211> 683

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de 41BB fusionado con extremo aminoterminal de ZAP de longitud completa

<400> 41

Met Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
1 5 10 15

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
20 25 30

ES 2 791 338 T3

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Ser Gly Gly Gly Gly
 35 40 45
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55 60
 Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser
 65 70 75 80
 Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly
 85 90 95
 Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu
 100 105 110
 Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His His Phe Pro Ile Glu Arg Gln
 115 120 125
 Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly Gly Lys Ala His Cys Gly Pro
 130 135 140
 Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys
 145 150 155 160
 Asn Leu Arg Lys Pro Cys Asn Arg Pro Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro
 165 170 175
 Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
 180 185 190
 Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
 195 200 205
 Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
 210 215 220
 Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
 225 230 235 240
 Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
 245 250 255
 Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
 260 265 270
 Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro
 275 280 285

ES 2 791 338 T3

Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys
 290 295 300

Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
 305 310 315 320

Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
 325 330 335

His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Gln Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn
 340 345 350

Ser Asp Gly Tyr Thr Pro Glu Pro Ala Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys
 355 360 365

Pro Arg Pro Met Pro Met Asp Thr Ser Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser
 370 375 380

Asp Pro Glu Glu Leu Lys Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn
 385 390 395 400

Leu Leu Ile Ala Asp Ile Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val
 405 410 415

Arg Gln Gly Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile
 420 425 430

Lys Val Leu Lys Gln Gly Thr Glu Lys Ala Asp Thr Glu Glu Met Met
 435 440 445

Arg Glu Ala Gln Ile Met His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg
 450 455 460

Leu Ile Gly Val Cys Gln Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met
 465 470 475 480

Ala Gly Gly Gly Pro Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu
 485 490 495

Ile Pro Val Ser Asn Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly
 500 505 510

Met Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 515 520 525

Arg Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe
 530 535 540

ES 2 791 338 T3

Gly Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg
545 550 555 560

Ser Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn
565 570 575

Phe Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr
580 585 590

Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys
595 600 605

Gly Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys
610 615 620

Pro Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp
625 630 635 640

Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg
645 650 655

Met Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro
660 665 670

Gly Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala
675 680

<210> 42

<211> 677

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de OX40 fusionado con extremo aminoterminal de ZAP de longitud completa

<400> 42

Met Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Pro Asp Pro Ala Ala
50 55 60

ES 2 791 338 T3

His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser Arg Ala Glu Ala Glu Glu
 65 70 75 80

His Leu Lys Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly Leu Phe Leu Leu Arg Gln
 85 90 95

Cys Leu Arg Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu Ser Leu Val His Asp Val
 100 105 110

Arg Phe His His Phe Pro Ile Glu Arg Gln Leu Asn Gly Thr Tyr Ala
 115 120 125

Ile Ala Gly Gly Lys Ala His Cys Gly Pro Ala Glu Leu Cys Glu Phe
 130 135 140

Tyr Ser Arg Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys Asn Leu Arg Lys Pro Cys
 145 150 155 160

Asn Arg Pro Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro Gly Val Phe Asp Cys Leu
 165 170 175

Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg Gln Thr Trp Lys Leu Glu
 180 185 190

Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser Gln Ala Pro Gln Val Glu
 195 200 205

Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg Met Pro Trp Tyr His Ser
 210 215 220

Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys Leu Tyr Ser Gly Ala Gln
 225 230 235 240

Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg Lys Glu Gln Gly Thr Tyr
 245 250 255

Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val Tyr His Tyr Leu Ile Ser
 260 265 270

Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro Glu Gly Thr Lys Phe Asp
 275 280 285

Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys Leu Lys Ala Asp Gly Leu
 290 295 300

Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn Ser Ser Ala Ser Asn Ala
 305 310 315 320

ES 2 791 338 T3

Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala His Pro Ser Thr Leu Thr
 325 330 335
 His Pro Gln Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn Ser Asp Gly Tyr Thr Pro
 340 345 350
 Glu Pro Ala Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys Pro Arg Pro Met Pro Met
 355 360 365
 Asp Thr Ser Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser Asp Pro Glu Glu Leu Lys
 370 375 380
 Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn Leu Leu Ile Ala Asp Ile
 385 390 395 400
 Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val Arg Gln Gly Val Tyr Arg
 405 410 415
 Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile Lys Val Leu Lys Gln Gly
 420 425 430
 Thr Glu Lys Ala Asp Thr Glu Glu Met Met Arg Glu Ala Gln Ile Met
 435 440 445
 His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg Leu Ile Gly Val Cys Gln
 450 455 460
 Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met Ala Gly Gly Gly Pro Leu
 465 470 475 480
 His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu Ile Pro Val Ser Asn Val
 485 490 495
 Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly Met Lys Tyr Leu Glu Glu
 500 505 510
 Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Val
 515 520 525
 Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser Lys Ala Leu
 530 535 540
 Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser Ala Gly Lys Trp Pro
 545 550 555 560
 Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn Phe Arg Lys Phe Ser Ser

ES 2 791 338 T3

565

570

575

Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Met Trp Glu Ala Leu Ser
580 585 590

Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys Gly Pro Glu Val Met Ala
595 600 605

Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys Pro Pro Glu Cys Pro Pro
610 615 620

Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp Ile Tyr Lys Trp Glu Asp
625 630 635 640

Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg Met Arg Ala Cys Tyr Tyr
645 650 655

Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro Gly Ser Thr Gln Lys Ala
660 665 670

Glu Ala Ala Cys Ala
675

<210> 43

<211> 276

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> endodominio de CD28 fusionado con extremo aminoterminal de dominio SH2 de PTPN6

<400> 43

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

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

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met
50 55 60

Val Arg Trp Phe His Arg Asp Leu Ser Gly Leu Asp Ala Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Lys Gly Arg Gly Val His Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser Arg
85 90 95

ES 2 791 338 T3

Lys Asn Gln Gly Asp Phe Ser Leu Ser Val Arg Val Gly Asp Gln Val
 100 105 110
 Thr His Ile Arg Ile Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr Gly
 115 120 125
 Gly Glu Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu Leu Val Glu Tyr Tyr Thr Gln
 130 135 140
 Gln Gln Gly Val Leu Gln Asp Arg Asp Gly Thr Ile Ile His Leu Lys
 145 150 155 160
 Tyr Pro Leu Asn Cys Ser Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp Tyr His Gly
 165 170 175
 His Met Ser Gly Gly Gln Ala Glu Thr Leu Leu Gln Ala Lys Gly Glu
 180 185 190
 Pro Trp Thr Phe Leu Val Arg Glu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Asp Phe
 195 200 205
 Val Leu Ser Val Leu Ser Asp Gln Pro Lys Ala Gly Pro Gly Ser Pro
 210 215 220
 Leu Arg Val Thr His Ile Lys Val Met Cys Glu Gly Gly Arg Tyr Thr
 225 230 235 240
 Val Gly Gly Leu Glu Thr Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu His
 245 250 255
 Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Glu Ala Ser Gly Ala Phe Val Tyr Leu
 260 265 270
 Arg Gln Pro Tyr
 275

<210> 44
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> endodominio de 41BB fusionado con extremo aminoterminal de dominio SH2 de PTPN6

<400> 44

Met Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 1 5 10 15

ES 2 791 338 T3

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
20 25 30

Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Ser Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
50 55 60

Met Val Arg Trp Phe His Arg Asp Leu Ser Gly Leu Asp Ala Glu Thr
65 70 75 80

Leu Leu Lys Gly Arg Gly Val His Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser
85 90 95

Arg Lys Asn Gln Gly Asp Phe Ser Leu Ser Val Arg Val Gly Asp Gln
100 105 110

Val Thr His Ile Arg Ile Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr
115 120 125

Gly Gly Glu Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu Leu Val Glu Tyr Tyr Thr
130 135 140

Gln Gln Gln Gly Val Leu Gln Asp Arg Asp Gly Thr Ile Ile His Leu
145 150 155 160

Lys Tyr Pro Leu Asn Cys Ser Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp Tyr His
165 170 175

Gly His Met Ser Gly Gly Gln Ala Glu Thr Leu Leu Gln Ala Lys Gly
180 185 190

Glu Pro Trp Thr Phe Leu Val Arg Glu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Asp
195 200 205

Phe Val Leu Ser Val Leu Ser Asp Gln Pro Lys Ala Gly Pro Gly Ser
210 215 220

Pro Leu Arg Val Thr His Ile Lys Val Met Cys Glu Gly Gly Arg Tyr
225 230 235 240

Thr Val Gly Gly Leu Glu Thr Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu
245 250 255

His Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Glu Ala Ser Gly Ala Phe Val Tyr
260 265 270

Leu Arg Gln Pro Tyr
275

5 <210> 45
<211> 271
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Endodominio de OX40 fusionado con extremo aminoterminal de dominio SH2 de PTPN6

ES 2 791 338 T3

<400> 45

Met Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Val Arg Trp Phe His
50 55 60

Arg Asp Leu Ser Gly Leu Asp Ala Glu Thr Leu Leu Lys Gly Arg Gly
65 70 75 80

Val His Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser Arg Lys Asn Gln Gly Asp
85 90 95

Phe Ser Leu Ser Val Arg Val Gly Asp Gln Val Thr His Ile Arg Ile
100 105 110

Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr Gly Gly Glu Lys Phe Ala
115 120 125

Thr Leu Thr Glu Leu Val Glu Tyr Tyr Thr Gln Gln Gln Gly Val Leu
130 135 140

Gln Asp Arg Asp Gly Thr Ile Ile His Leu Lys Tyr Pro Leu Asn Cys
145 150 155 160

Ser Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp Tyr His Gly His Met Ser Gly Gly
165 170 175

Gln Ala Glu Thr Leu Leu Gln Ala Lys Gly Glu Pro Trp Thr Phe Leu
180 185 190

Val Arg Glu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Asp Phe Val Leu Ser Val Leu
195 200 205

Ser Asp Gln Pro Lys Ala Gly Pro Gly Ser Pro Leu Arg Val Thr His
210 215 220

Ile Lys Val Met Cys Glu Gly Gly Arg Tyr Thr Val Gly Gly Leu Glu
225 230 235 240

Thr Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu His Phe Lys Lys Thr Gly
245 250 255

Ile Glu Glu Ala Ser Gly Ala Phe Val Tyr Leu Arg Gln Pro Tyr
260 265 270

<210> 46

<211> 350

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Dominio de quinasa Akt

<400> 46

Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu Ala Lys Pro Lys His Arg Val Thr
1 5 10 15

Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly
20 25 30

Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr Ala Met
35 40 45

Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val Ala His
50 55 60

Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro Phe Leu
65 70 75 80

Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys Phe Val
85 90 95

Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu
100 105 110

Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val
115 120 125

ES 2 791 338 T3

Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr Arg Asp
130 135 140

Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile
145 150 155 160

Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala Thr Met
165 170 175

Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu
180 185 190

Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val
195 200 205

Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His
210 215 220

Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe Pro Arg
225 230 235 240

Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Lys Lys
245 250 255

Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys Glu Ile
260 265 270

Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val Tyr Glu
275 280 285

Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp
290 295 300

Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr Ile Thr
305 310 315 320

Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu Arg Arg
325 330 335

Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala
340 345 350

<210> 47

<211> 630

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio ZAP70-SH2 fusionado directamente con un dominio de quinasa Akt

ES 2 791 338 T3

<400> 47

Met	Pro	Asp	Pro	Ala	Ala	His	Leu	Pro	Phe	Phe	Tyr	Gly	Ser	Ile	Ser	1	5	10	15
Arg	Ala	Glu	Ala	Glu	Glu	His	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Met	Ala	Asp	Gly	20	25	30	
Leu	Phe	Leu	Leu	Arg	Gln	Cys	Leu	Arg	Ser	Leu	Gly	Gly	Tyr	Val	Leu	35	40	45	
Ser	Leu	Val	His	Asp	Val	Arg	Phe	His	His	Phe	Pro	Ile	Glu	Arg	Gln	50	55	60	
Leu	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ala	Gly	Gly	Lys	Ala	His	Cys	Gly	Pro	65	70	75	80
Ala	Glu	Leu	Cys	Glu	Phe	Tyr	Ser	Arg	Asp	Pro	Asp	Gly	Leu	Pro	Cys	85	90	95	
Asn	Leu	Arg	Lys	Pro	Cys	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Leu	Glu	Pro	Gln	Pro	100	105	110	
Gly	Val	Phe	Asp	Cys	Leu	Arg	Asp	Ala	Met	Val	Arg	Asp	Tyr	Val	Arg	115	120	125	
Gln	Thr	Trp	Lys	Leu	Glu	Gly	Glu	Ala	Leu	Glu	Gln	Ala	Ile	Ile	Ser	130	135	140	
Gln	Ala	Pro	Gln	Val	Glu	Lys	Leu	Ile	Ala	Thr	Thr	Ala	His	Glu	Arg	145	150	155	160
Met	Pro	Trp	Tyr	His	Ser	Ser	Leu	Thr	Arg	Glu	Glu	Ala	Glu	Arg	Lys	165	170	175	
Leu	Tyr	Ser	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Gly	Lys	Phe	Leu	Leu	Arg	Pro	Arg	180	185	190	
Lys	Glu	Gln	Gly	Thr	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Gly	Lys	Thr	Val	195	200	205	
Tyr	His	Tyr	Leu	Ile	Ser	Gln	Asp	Lys	Ala	Gly	Lys	Tyr	Cys	Ile	Pro	210	215	220	
Glu	Gly	Thr	Lys	Phe	Asp	Thr	Leu	Trp	Gln	Leu	Val	Glu	Tyr	Leu	Lys	225	230	235	240

ES 2 791 338 T3

Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
 245 250 255
 Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
 260 265 270
 His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu
 275 280 285
 Ala Lys Pro Lys His Arg Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys
 290 295 300
 Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile
 325 330 335
 Val Ala Lys Asp Glu Val Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu
 340 345 350
 Gln Asn Ser Arg His Pro Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln
 355 360 365
 Thr His Asp Arg Leu Cys Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu
 370 375 380
 Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala
 385 390 395 400
 Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser
 405 410 415
 Glu Lys Asn Val Val Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu
 420 425 430
 Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu
 435 440 445
 Gly Ile Lys Asp Gly Ala Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu
 450 455 460
 Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val
 465 470 475 480
 Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg
 485 490 495

ES 2 791 338 T3

Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu
500 505 510

Met Glu Glu Ile Arg Phe Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser
515 520 525

Leu Leu Ser Gly Leu Leu Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly
530 535 540

Gly Ser Glu Asp Ala Lys Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly
545 550 555 560

Ile Val Trp Gln His Val Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys
565 570 575

Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe
580 585 590

Thr Ala Gln Met Ile Thr Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met
595 600 605

Glu Cys Val Asp Ser Glu Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr
610 615 620

Ser Ala Ser Gly Thr Ala
625 630

<210> 48

<211> 651

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio ZAP70-SH2 fusionado con un dominio de quinasa Akt mediante un conector

<400> 48

Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser
1 5 10 15

Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly
20 25 30

Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu
35 40 45

Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His His Phe Pro Ile Glu Arg Gln
50 55 60

ES 2 791 338 T3

Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly Gly Lys Ala His Cys Gly Pro
 65 70 75 80
 Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys
 85 90 95
 Asn Leu Arg Lys Pro Cys Asn Arg Pro Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro
 100 105 110
 Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
 115 120 125
 Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
 130 135 140
 Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
 145 150 155 160
 Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
 180 185 190
 Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
 195 200 205
 Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro
 210 215 220
 Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
 245 250 255
 Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
 260 265 270
 His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 275 280 285
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Glu
 290 295 300
 Met Glu Val Ser Leu Ala Lys Pro Lys His Arg Val Thr Met Asn Glu
 305 310 315 320

ES 2 791 338 T3

Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly Lys Val Ile
 325 330 335
 Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr Ala Met Lys Ile Leu
 340 345 350
 Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val Ala His Thr Leu Thr
 355 360 365
 Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro Phe Leu Thr Ala Leu
 370 375 380
 Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys Phe Val Met Glu Tyr
 385 390 395 400
 Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu Arg Val Phe
 405 410 415
 Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val Ser Ala Leu
 420 425 430
 Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr Arg Asp Leu Lys Leu
 435 440 445
 Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr Asp Phe
 450 455 460
 Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala Thr Met Lys Thr Phe
 465 470 475 480
 Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp Asn Asp
 485 490 495
 Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met Tyr Glu
 500 505 510
 Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu Lys Leu
 515 520 525
 Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe Pro Arg Thr Leu Gly
 530 535 540
 Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Lys Lys Asp Pro Lys
 545 550 555 560
 Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys Glu Ile Met Gln His
 565 570 575

ES 2 791 338 T3

Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val Tyr Glu Lys Lys Leu
580 585 590

Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr Arg Tyr
595 600 605

Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr Ile Thr Pro Pro Asp
610 615 620

Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu Arg Arg Pro His Phe
625 630 635 640

Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala
645 650

<210> 49

<211> 630

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ZAP70 mutado para ser no funcional y fusionado con un dominio de quinasa Akt

<400> 49

Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser
1 5 10 15

Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly
20 25 30

Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu
35 40 45

Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His His Phe Pro Ile Glu Arg Gln
50 55 60

Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly Gly Lys Ala His Cys Gly Pro
65 70 75 80

Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys
85 90 95

Asn Leu Arg Lys Pro Cys Asn Arg Pro Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro
100 105 110

Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
115 120 125

ES 2 791 338 T3

Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
 130 135 140
 Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
 145 150 155 160
 Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Lys Pro Arg
 180 185 190
 Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
 195 200 205
 Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro
 210 215 220
 Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
 245 250 255
 Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
 260 265 270
 His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu
 275 280 285
 Ala Lys Pro Lys His Arg Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys
 290 295 300
 Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile
 325 330 335
 Val Ala Lys Asp Glu Val Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu
 340 345 350
 Gln Asn Ser Arg His Pro Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln
 355 360 365
 Thr His Asp Arg Leu Cys Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu

ES 2 791 338 T3

370 375 380
 Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala
 385 390 395 400
 Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser
 405 410 415
 Glu Lys Asn Val Val Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu
 420 425 430
 Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu
 435 440 445
 Gly Ile Lys Asp Gly Ala Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu
 450 455 460
 Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val
 465 470 475 480
 Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg
 485 490 495
 Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu
 500 505 510
 Met Glu Glu Ile Arg Phe Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser
 515 520 525
 Leu Leu Ser Gly Leu Leu Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly
 530 535 540
 Gly Ser Glu Asp Ala Lys Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly
 545 550 555 560
 Ile Val Trp Gln His Val Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys
 565 570 575
 Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe
 580 585 590
 Thr Ala Gln Met Ile Thr Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met
 595 600 605
 Glu Cys Val Asp Ser Glu Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr
 610 615 620
 Ser Ala Ser Gly Thr Ala
 625 630

5

<210> 50
 <211> 590
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> dominio que contiene quinasa de JAK2

ES 2 791 338 T3

<400> 50

Arg Asn Glu Asp Leu Ile Phe Asn Glu Ser Leu Gly Gln Gly Thr Phe
1 5 10 15

Thr Lys Ile Phe Lys Gly Val Arg Arg Glu Val Gly Asp Tyr Gly Gln
20 25 30

Leu His Glu Thr Glu Val Leu Leu Lys Val Leu Asp Lys Ala His Arg
35 40 45

Asn Tyr Ser Glu Ser Phe Phe Glu Ala Ala Ser Met Met Ser Lys Leu
50 55 60

Ser His Lys His Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Val Cys Gly Asp
65 70 75 80

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

Tyr Leu Lys Lys Asn Lys Asn Cys Ile Asn Ile Leu Trp Lys Leu Glu
100 105 110

Val Ala Lys Gln Leu Ala Trp Ala Met His Phe Leu Glu Glu Asn Thr
115 120 125

Leu Ile His Gly Asn Val Cys Ala Lys Asn Ile Leu Leu Ile Arg Glu
130 135 140

Glu Asp Arg Lys Thr Gly Asn Pro Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro
145 150 155 160

Gly Ile Ser Ile Thr Val Leu Pro Lys Asp Ile Leu Gln Glu Arg Ile
165 170 175

Pro Trp Val Pro Pro Glu Cys Ile Glu Asn Pro Lys Asn Leu Asn Leu
180 185 190

Ala Thr Asp Lys Trp Ser Phe Gly Thr Thr Leu Trp Glu Ile Cys Ser

ES 2 791 338 T3

195					200					205					
Gly	Gly	Asp	Lys	Pro	Leu	Ser	Ala	Leu	Asp	Ser	Gln	Arg	Lys	Leu	Gln
210						215					220				
Phe	Tyr	Glu	Asp	Arg	His	Gln	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Trp	Ala	Glu	Leu
225					230					235					240
Ala	Asn	Leu	Ile	Asn	Asn	Cys	Met	Asp	Tyr	Glu	Pro	Asp	Phe	Arg	Pro
				245					250					255	
Ser	Phe	Arg	Ala	Ile	Ile	Arg	Asp	Leu	Asn	Ser	Leu	Phe	Thr	Pro	Asp
			260					265					270		
Tyr	Glu	Leu	Leu	Thr	Glu	Asn	Asp	Met	Leu	Pro	Asn	Met	Arg	Ile	Gly
	275						280					285			
Ala	Leu	Gly	Phe	Ser	Gly	Ala	Phe	Glu	Asp	Arg	Asp	Pro	Thr	Gln	Phe
	290					295					300				
Glu	Glu	Arg	His	Leu	Lys	Phe	Leu	Gln	Gln	Leu	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe
305					310					315					320
Gly	Ser	Val	Glu	Met	Cys	Arg	Tyr	Asp	Pro	Leu	Gln	Asp	Asn	Thr	Gly
				325					330					335	
Glu	Val	Val	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Gln	His	Ser	Thr	Glu	Glu	His	Leu
			340					345					350		
Arg	Asp	Phe	Glu	Arg	Glu	Ile	Glu	Ile	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	His	Asp
	355						360						365		
Asn	Ile	Val	Lys	Tyr	Lys	Gly	Val	Cys	Tyr	Ser	Ala	Gly	Arg	Arg	Asn
	370					375					380				
Leu	Lys	Leu	Ile	Met	Glu	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Gly	Ser	Leu	Arg	Asp	Tyr
385					390					395					400
Leu	Gln	Lys	His	Lys	Glu	Arg	Ile	Asp	His	Ile	Lys	Leu	Leu	Gln	Tyr
				405					410					415	
Thr	Ser	Gln	Ile	Cys	Lys	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Gly	Thr	Lys	Arg	Tyr
			420					425					430		
Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Thr	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Glu	Asn	Glu	Asn
		435					440					445			

ES 2 791 338 T3

Arg Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Thr Lys Val Leu Pro Gln Asp
450 455 460

Lys Glu Tyr Tyr Lys Val Lys Glu Pro Gly Glu Ser Pro Ile Phe Trp
465 470 475 480

Tyr Ala Pro Glu Ser Leu Thr Glu Ser Lys Phe Ser Val Ala Ser Asp
485 490 495

Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Tyr Glu Leu Phe Thr Tyr Ile Glu
500 505 510

Lys Ser Lys Ser Pro Pro Ala Glu Phe Met Arg Met Ile Gly Asn Asp
515 520 525

Lys Gln Gly Gln Met Ile Val Phe His Leu Ile Glu Leu Leu Lys Asn
530 535 540

Asn Gly Arg Leu Pro Arg Pro Asp Gly Cys Pro Asp Glu Ile Tyr Met
545 550 555 560

Ile Met Thr Glu Cys Trp Asn Asn Asn Val Asn Gln Arg Pro Ser Phe
565 570 575

Arg Asp Leu Ala Leu Arg Val Asp Gln Ile Arg Asp Asn Met
580 585 590

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sitio de corte de consenso del virus del grabado del tabaco (TEV)

<400> 51

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
1 5

<210> 52

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de proteasa del TeV

<400> 52

Ser Leu Phe Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Thr Ile
1 5 10 15

ES 2 791 338 T3

Cys His Leu Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly
 20 25 30
 Ile Gly Phe Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe Arg Arg
 35 40 45
 Asn Asn Gly Thr Leu Leu Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val
 50 55 60
 Lys Asn Thr Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met
 65 70 75 80
 Ile Ile Ile Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu
 85 90 95
 Lys Phe Arg Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr
 100 105 110
 Asn Phe Gln Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys
 115 120 125
 Thr Phe Pro Ser Ser Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr
 130 135 140
 Lys Asp Gly Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe
 145 150 155 160
 Ile Val Gly Ile His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Phe Thr Ser Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu
 180 185 190
 Ala Gln Gln Trp Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu
 195 200 205
 Trp Gly Gly His Lys Val Phe Met Ser Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln
 210 215 220
 Pro Val Lys Glu Ala Thr Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
 225 230 235 240

<210> 53
 <211> 541
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio ZAP70-SH2 fusionado con una secuencia de proteasa del TEV

<400> 53

Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser
1 5 10 15

Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly
20 25 30

Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu
35 40 45

Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His His Phe Pro Ile Glu Arg Gln
50 55 60

Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly Gly Lys Ala His Cys Gly Pro
65 70 75 80

Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys
85 90 95

Asn Leu Arg Lys Pro Cys Asn Arg Pro Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro
100 105 110

Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
115 120 125

Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
130 135 140

Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
145 150 155 160

Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
165 170 175

Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
180 185 190

Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
195 200 205

Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro
210 215 220

Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys
225 230 235 240

ES 2 791 338 T3

Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
 245 250 255
 Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
 260 265 270
 His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 275 280 285
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Leu Phe
 290 295 300
 Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Thr Ile Cys His Leu
 305 310 315 320
 Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe
 325 330 335
 Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly
 340 345 350
 Thr Leu Leu Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asn Thr
 355 360 365
 Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile
 370 375 380
 Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg
 385 390 395 400
 Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln
 405 410 415
 Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro
 420 425 430
 Ser Ser Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly
 435 440 445
 Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly
 450 455 460
 Ile His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser
 465 470 475 480
 Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln
 485 490 495
 Trp Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly
 500 505 510
 His Lys Val Phe Met Ser Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys
 515 520 525
 Glu Ala Thr Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
 530 535 540

ES 2 791 338 T3

<210> 54
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> dominio PTPN6-SH2 fusionado con una secuencia de proteasa del TEV

<400> 54

10

Met	Val	Arg	Trp	Phe	His	Arg	Asp	Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Ala	Glu	Thr	1	5	10	15
Leu	Leu	Lys	Gly	Arg	Gly	Val	His	Gly	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg	Pro	Ser	20	25	30	
Arg	Lys	Asn	Gln	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Ser	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Gln	35	40	45	
Val	Thr	His	Ile	Arg	Ile	Gln	Asn	Ser	Gly	Asp	Phe	Tyr	Asp	Leu	Tyr	50	55	60	
Gly	Gly	Glu	Lys	Phe	Ala	Thr	Leu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Tyr	Tyr	Thr	65	70	75	80
Gln	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Gln	Asp	Arg	Asp	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Leu	85	90	95	
Lys	Tyr	Pro	Leu	Asn	Cys	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Glu	Arg	Trp	Tyr	His	100	105	110	
Gly	His	Met	Ser	Gly	Gly	Gln	Ala	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Gly	115	120	125	
Glu	Pro	Trp	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Glu	Ser	Leu	Ser	Gln	Pro	Gly	Asp	130	135	140	
Phe	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Asp	Gln	Pro	Lys	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	145	150	155	160

ES 2 791 338 T3

Pro Leu Arg Val Thr His Ile Lys Val Met Cys Glu Gly Gly Arg Tyr
165 170 175

Thr Val Gly Gly Leu Glu Thr Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu
180 185 190

His Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Glu Ala Ser Gly Ala Phe Val Tyr
195 200 205

Leu Arg Gln Pro Tyr Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Leu Phe Lys
210 215 220

Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Thr Ile Cys His Leu Thr
225 230 235 240

Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe Gly
245 250 255

Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly Thr
260 265 270

Leu Leu Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asn Thr Thr
275 280 285

Thr Leu Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg
290 295 300

Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu
305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr
325 330 335

Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser
340 345 350

Ser Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln
355 360 365

Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile
370 375 380

His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val
385 390 395 400

Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp
405 410 415

Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His
420 425 430

Lys Val Phe Met Ser Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu
435 440 445

Ala Thr Gln Leu Met Asn Glu Leu Val Tyr Ser Gln
450 455 460

ES 2 791 338 T3

<210> 55
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> factor de transcripción anclado a membrana

<400> 55

10

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

Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly
20          25          30

Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser
35          40          45

Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser
50          55          60

Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro
65          70          75          80

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
85          90          95

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
100         105         110

Asp Phe Ala Cys Asp Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly
115         120         125

Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg
130         135         140

His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ala Gln Ile Lys Arg Val Val
145         150         155         160
```

ES 2 791 338 T3

Ser Glu Lys Lys Thr Ala Gln Ala Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys
165 170 175

Ser Pro Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Met
180 185 190

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly
195 200 205

Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp
210 215 220

Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro
225 230 235 240

Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp
245 250 255

Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile
260 265 270

Asp Glu Tyr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Met Gln Ile Leu Val Ala
275 280 285

Ser Asp Ala Thr Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp
290 295 300

Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys
305 310 315 320

Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr
325 330 335

Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg
340 345 350

Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp
355 360 365

Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu
370 375 380

Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr
385 390 395 400

Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln
405 410 415

His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly
420 425 430

Gln Arg Gln Leu Thr Val
435

5 <210> 56
<211> 438

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> receptor diana

<400> 56

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

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp
35 40 45

Ile Tyr Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys
100 105 110

Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
165 170 175

10

ES 2 791 338 T3

Gly Phe Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro
180 185 190

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser
195 200 205

Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
210 215 220

Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly
245 250 255

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met
260 265 270

Asp Pro Ala Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val
275 280 285

His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro
290 295 300

Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr
305 310 315 320

Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp
325 330 335

Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala
340 345 350

Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val
355 360 365

Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr
370 375 380

Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr
385 390 395 400

Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly
405 410 415

Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly
420 425 430

His Cys Ser Trp Pro Leu
435

- 5 <210> 57
<211> 509
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> receptor que contiene un RAQ contra CD29 con un endodominio escindible

ES 2 791 338 T3

<400> 57

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

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
115 120 125

Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
145 150 155 160

Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly
165 170 175

Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
180 185 190

ES 2 791 338 T3

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser
 210 215 220
 Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
 225 230 235 240
 Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala
 245 250 255
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro
 260 265 270
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 275 280 285
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 290 295 300
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Phe Trp
 305 310 315 320
 Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
 325 330 335
 Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg
 340 345 350
 Gln Ala Glu Arg Met Ala Gln Ile Lys Arg Val Val Ser Glu Lys Lys
 355 360 365
 Thr Ala Gln Ala Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile Ser
 370 375 380
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Met Arg Arg Val Lys
 385 390 395 400
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 405 410 415
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 420 425 430
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg

ES 2 791 338 T3

435 440 445

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
450 455 460

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
465 470 475 480

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
485 490 495

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
500 505

<210> 58
 5 <211> 827
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> receptor que contiene un RA1 contra CD19 con un endodominio CD3-zeta y un endodominio de CD148
 escindible

<400> 58

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

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
115 120 125

Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
15

ES 2 791 338 T3

130		135		140
Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly			
145	150	155		160
Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly				
	165	170		175
Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg				
	180	185		190
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr				
	195	200		205
Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser				
	210	215		220
Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr				
	225	230		235
Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala				
	245	250		255
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro				
	260	265		270
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala				
	275	280		285
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly				
	290	295		300
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Phe Trp				
	305	310		315
Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val				
	325	330		335
Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Arg Val Lys Phe Ser Arg				
	340	345		350
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn				
	355	360		365
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg				
	370	375		380

ES 2 791 338 T3

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 385 390 395 400
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 405 410 415
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 420 425 430
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 435 440 445
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
 450 455 460
 Met Ala Val Phe Gly Cys Ile Phe Gly Ala Leu Val Ile Val Thr Val
 465 470 475 480
 Gly Gly Phe Ile Phe Trp Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ala Lys Asn Asn
 485 490 495
 Glu Val Ser Phe Ser Gln Ile Lys Pro Lys Lys Ser Lys Leu Ile Arg
 500 505 510
 Val Glu Asn Phe Glu Ala Tyr Phe Lys Lys Gln Gln Ala Asp Ser Asn
 515 520 525
 Cys Gly Phe Ala Glu Glu Tyr Glu Asp Leu Lys Leu Val Gly Ile Ser
 530 535 540
 Gln Pro Lys Tyr Ala Ala Glu Leu Ala Glu Asn Arg Gly Lys Asn Arg
 545 550 555 560
 Tyr Asn Asn Val Leu Pro Tyr Asp Ile Ser Arg Val Lys Leu Ser Val
 565 570 575
 Gln Thr His Ser Thr Asp Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Met Pro Gly
 580 585 590
 Tyr His Ser Lys Lys Asp Phe Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Asn
 595 600 605
 Thr Leu Lys Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Lys Asn Val Tyr Ala
 610 615 620
 Ile Ile Met Leu Thr Lys Cys Val Glu Gln Gly Arg Thr Lys Cys Glu
 625 630 635 640

ES 2 791 338 T3

Glu Tyr Trp Pro Ser Lys Gln Ala Gln Asp Tyr Gly Asp Ile Thr Val
645 650 655

Ala Met Thr Ser Glu Ile Val Leu Pro Glu Trp Thr Ile Arg Asp Phe
660 665 670

Thr Val Lys Asn Ile Gln Thr Ser Glu Ser His Pro Leu Arg Gln Phe
675 680 685

His Phe Thr Ser Trp Pro Asp His Gly Val Pro Asp Thr Thr Asp Leu
690 695 700

Leu Ile Asn Phe Arg Tyr Leu Val Arg Asp Tyr Met Lys Gln Ser Pro
705 710 715 720

Pro Glu Ser Pro Ile Leu Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr
725 730 735

Gly Thr Phe Ile Ala Ile Asp Arg Leu Ile Tyr Gln Ile Glu Asn Glu
740 745 750

Asn Thr Val Asp Val Tyr Gly Ile Val Tyr Asp Leu Arg Met His Arg
755 760 765

Pro Leu Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Leu Asn Gln Cys
770 775 780

Val Leu Asp Ile Val Arg Ser Gln Lys Asp Ser Lys Val Asp Leu Ile
785 790 795 800

Tyr Gln Asn Thr Thr Ala Met Thr Ile Tyr Glu Asn Leu Ala Pro Val
805 810 815

Thr Thr Phe Gly Lys Thr Asn Gly Tyr Ile Ala
820 825

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido autoescindible 2a

<400> 59

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> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido autoescindible 2a

<400> 60

ES 2 791 338 T3

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

<210> 61
<211> 563
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> dominios SH2 duales de SHP-2 fusionados con dominio quinasa de ZAP70

<400> 61

Trp Phe His Pro Asn Ile Thr Gly Val Glu Ala Glu Asn Leu Leu Leu
1 5 10 15

Thr Arg Gly Val Asp Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser Lys Ser Asn
20 25 30

Pro Gly Asp Phe Thr Leu Ser Val Arg Arg Asn Gly Ala Val Thr His
35 40 45

Ile Lys Ile Gln Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Asp Leu Tyr Gly Gly Glu
50 55 60

Lys Phe Ala Thr Leu Ala Glu Leu Val Gln Tyr Tyr Met Glu His His
65 70 75 80

Gly Gln Leu Lys Glu Lys Asn Gly Asp Val Ile Glu Leu Lys Tyr Pro
85 90 95

Leu Asn Cys Ala Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp Phe His Gly His Leu
100 105 110

Ser Gly Lys Glu Ala Glu Lys Leu Leu Thr Glu Lys Gly Lys His Gly
115 120 125

ES 2 791 338 T3

Ser Phe Leu Val Arg Glu Ser Gln Ser His Pro Gly Asp Phe Val Leu
 130 135 140

Ser Val Arg Thr Gly Asp Asp Lys Gly Glu Ser Asn Asp Gly Lys Ser
 145 150 155 160

Lys Val Thr His Val Met Ile Arg Cys Gln Glu Leu Lys Tyr Asp Val
 165 170 175

Gly Gly Gly Glu Arg Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu His Tyr
 180 185 190

Lys Lys Asn Pro Met Val Glu Thr Leu Gly Thr Val Leu Gln Leu Lys
 195 200 205

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

Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala His Pro Ser Thr Leu
 225 230 235 240

Thr His Pro Gln Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn Ser Asp Gly Tyr Thr
 245 250 255

Pro Glu Pro Ala Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys Pro Arg Pro Met Pro
 260 265 270

Met Asp Thr Ser Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser Asp Pro Glu Glu Leu
 275 280 285

Lys Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn Leu Leu Ile Ala Asp
 290 295 300

Ile Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val Arg Gln Gly Val Tyr
 305 310 315 320

Arg Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile Lys Val Leu Lys Gln
 325 330 335

Gly Thr Glu Lys Ala Asp Thr Glu Glu Met Met Arg Glu Ala Gln Ile
 340 345 350

Met His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg Leu Ile Gly Val Cys
 355 360 365

Gln Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met Ala Gly Gly Gly Pro
 370 375 380

ES 2 791 338 T3

Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu Ile Pro Val Ser Asn
385 390 395 400

Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly Met Lys Tyr Leu Glu
405 410 415

Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu
420 425 430

Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser Lys Ala
435 440 445

Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser Ala Gly Lys Trp
450 455 460

Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn Phe Arg Lys Phe Ser
465 470 475 480

Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Met Trp Glu Ala Leu
485 490 495

Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys Gly Pro Glu Val Met
500 505 510

Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys Pro Pro Glu Cys Pro
515 520 525

Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp Ile Tyr Lys Trp Glu
530 535 540

Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg Met Arg Ala Cys Tyr
545 550 555 560

Tyr Ser Leu

<210> 62

<211> 567

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios SH2 duales de SHP-2 fusionados con un dominio de quinasa Akt

<400> 62

Trp Phe His Pro Asn Ile Thr Gly Val Glu Ala Glu Asn Leu Leu Leu
1 5 10 15

ES 2 791 338 T3

Thr Arg Gly Val Asp Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser Lys Ser Asn
 20 25 30
 Pro Gly Asp Phe Thr Leu Ser Val Arg Arg Asn Gly Ala Val Thr His
 35 40 45
 Ile Lys Ile Gln Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Asp Leu Tyr Gly Gly Glu
 50 55 60
 Lys Phe Ala Thr Leu Ala Glu Leu Val Gln Tyr Tyr Met Glu His His
 65 70 75 80
 Gly Gln Leu Lys Glu Lys Asn Gly Asp Val Ile Glu Leu Lys Tyr Pro
 85 90 95
 Leu Asn Cys Ala Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp Phe His Gly His Leu
 100 105 110
 Ser Gly Lys Glu Ala Glu Lys Leu Leu Thr Glu Lys Gly Lys His Gly
 115 120 125
 Ser Phe Leu Val Arg Glu Ser Gln Ser His Pro Gly Asp Phe Val Leu
 130 135 140
 Ser Val Arg Thr Gly Asp Asp Lys Gly Glu Ser Asn Asp Gly Lys Ser
 145 150 155 160
 Lys Val Thr His Val Met Ile Arg Cys Gln Glu Leu Lys Tyr Asp Val
 165 170 175
 Gly Gly Gly Glu Arg Phe Asp Ser Leu Thr Asp Leu Val Glu His Tyr
 180 185 190
 Lys Lys Asn Pro Met Val Glu Thr Leu Gly Thr Val Leu Gln Leu Lys
 195 200 205
 Gln Pro Leu Asn Thr Thr Arg Ile Asn Ala Glu Glu Met Glu Val Ser
 210 215 220
 Leu Ala Lys Pro Lys His Arg Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu
 225 230 235 240
 Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu
 245 250 255
 Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val
 260 265 270

ES 2 791 338 T3

Ile Val Ala Lys Asp Glu Val Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val
 275 280 285
 Leu Gln Asn Ser Arg His Pro Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe
 290 295 300
 Gln Thr His Asp Arg Leu Cys Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly
 305 310 315 320
 Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg
 325 330 335
 Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His
 340 345 350
 Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met
 355 360 365
 Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys
 370 375 380
 Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro
 385 390 395 400
 Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala
 405 410 415
 Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly
 420 425 430
 Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile
 435 440 445
 Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys
 450 455 460
 Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala
 485 490 495
 Gly Ile Val Trp Gln His Val Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe
 500 505 510
 Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu

ES 2 791 338 T3

	515		520		525
	Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser				
	530		535		540
	Met Glu Cys Val Asp Ser Glu Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser				
	545		550		555
					560
	Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala				
			565		
5	<210> 63 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial				
10	<220> <223> Secuencia de ITIM conservado				
15	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(1) <223> Xaa puede ser Ser, Ile, Val o Leu				
20	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(2) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural				
25	<220> <221> misc_feature <222> (4)..(5) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural				
30	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (6)..(6) <223> Xaa puede ser Ile, Val o Leu				
35	<400> 63 Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa 1 5				

REIVINDICACIONES

1. Células que comprende un receptor de antígeno quimérico (RAQ) y una proteína truncada que comprende un dominio SH2 de una proteína que se une a un motivo de inhibición de inmunorreceptor a base de tirosinas (ITIM) fosforilado pero que no presenta un dominio de fosfatasa.
5
2. Célula según la reivindicación 1, en la que la proteína truncada comprende el dominio SH2 de PTPN6 pero no presenta el dominio de fosfatasa de PTPN6.
- 10 3. Célula según la reivindicación 1, en la que la proteína truncada comprende el dominio SH2 de SHP-2 pero no presenta el dominio de fosfatasa de SHP-2.
4. Célula según la reivindicación 1, en la que la proteína truncada comprende la secuencia mostrada en SEC ID nº 6 o una o ambas secuencias mostradas en SEC ID nº 7 y nº 8.
15
5. Célula según la reivindicación 1, en la que la proteína truncada comprende o consiste en la secuencia mostrada en SEC ID nº 10, nº 11 o nº 12.
- 20 6. Constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína truncada según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y una secuencia de ácido nucleico codificante de un receptor de antígeno quimérico.
7. Vector que comprende un constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 6.
- 25 8. Conjunto de vectores que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína truncada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una secuencia de ácido nucleico codificante de un receptor de antígeno quimérico.
- 30 9. Composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, para la utilización en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.
- 35 11. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 10, en la que el método de tratamiento y/o prevención comprende las etapas siguientes:
40 (i) provisión de una muestra que contiene células a partir de un sujeto,
(ii) transducción o transfección de las células con un constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 6, un vector según la reivindicación 7 o conjunto de vectores según la reivindicación 8, y
(iii) administración de las células de (ii) en el sujeto.
12. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 10 o 11, en la que dicha enfermedad es cáncer.
45
13. Método para producir una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende la etapa de introducir: un constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 6, un vector según la reivindicación 7 o un conjunto de vectores según la reivindicación 8, en la célula *ex vivo*.
- 50 14. Método según la reivindicación 13, en el que la célula es de una muestra aislada a partir de un sujeto.

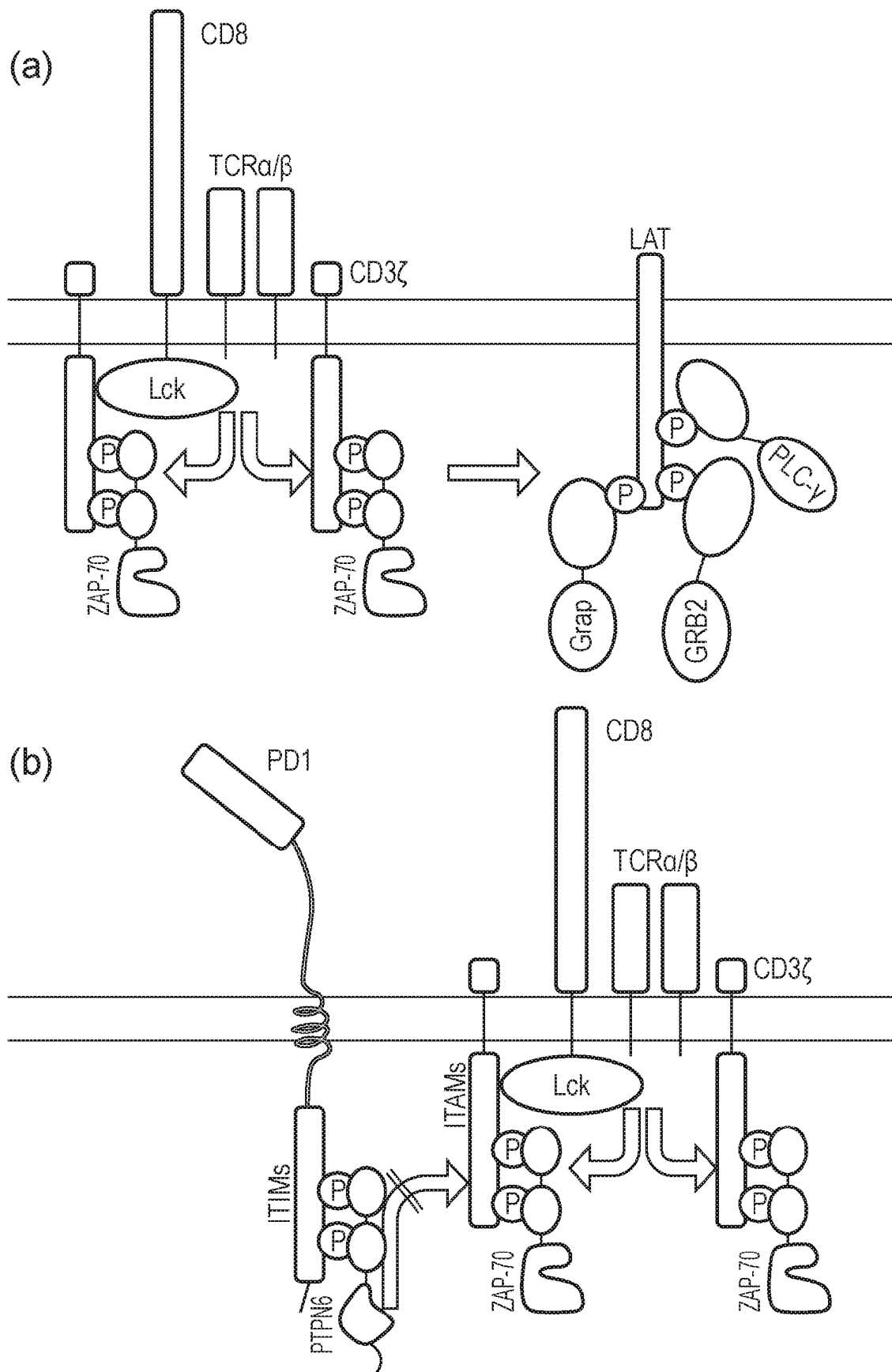


FIG. 1

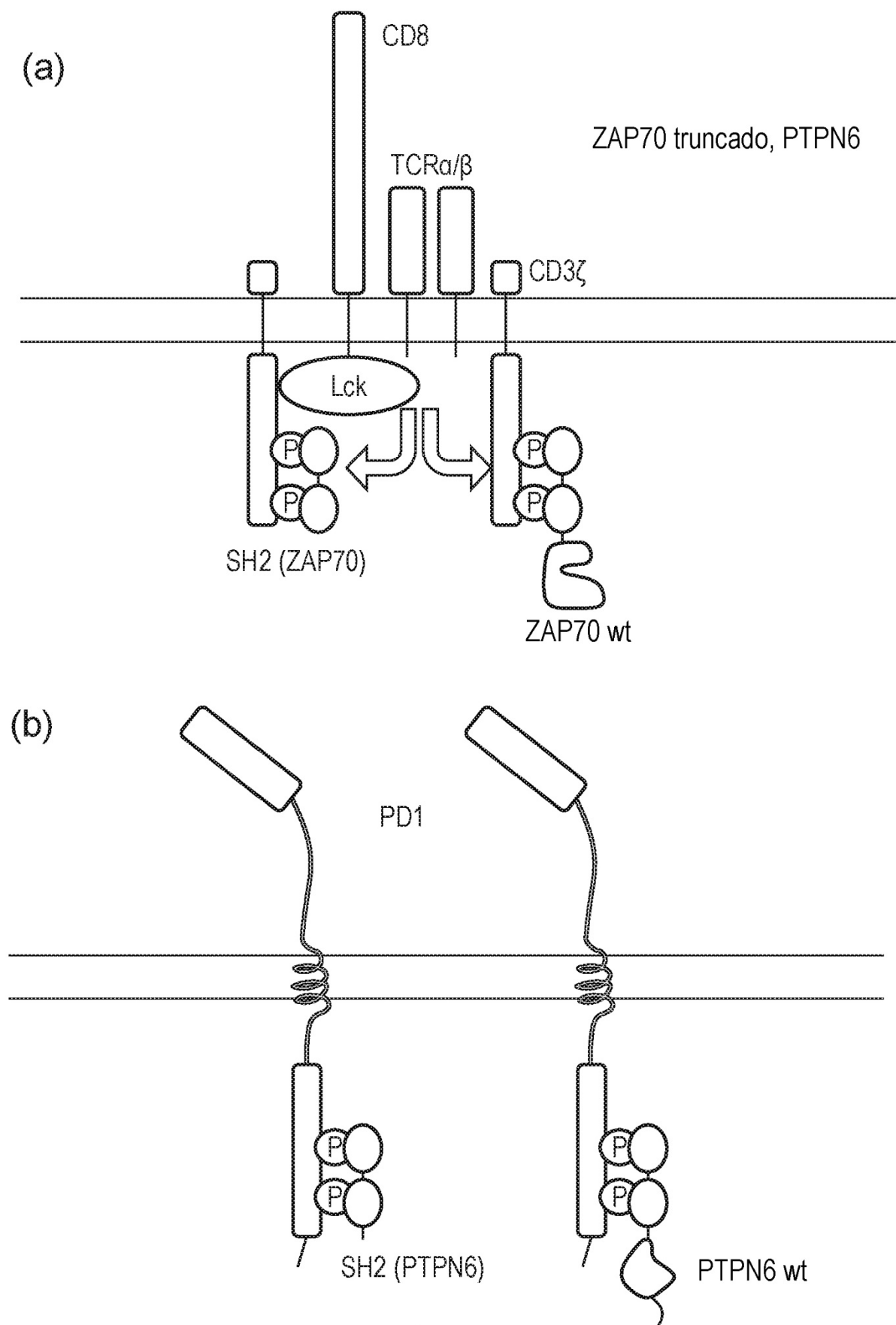


FIG. 2

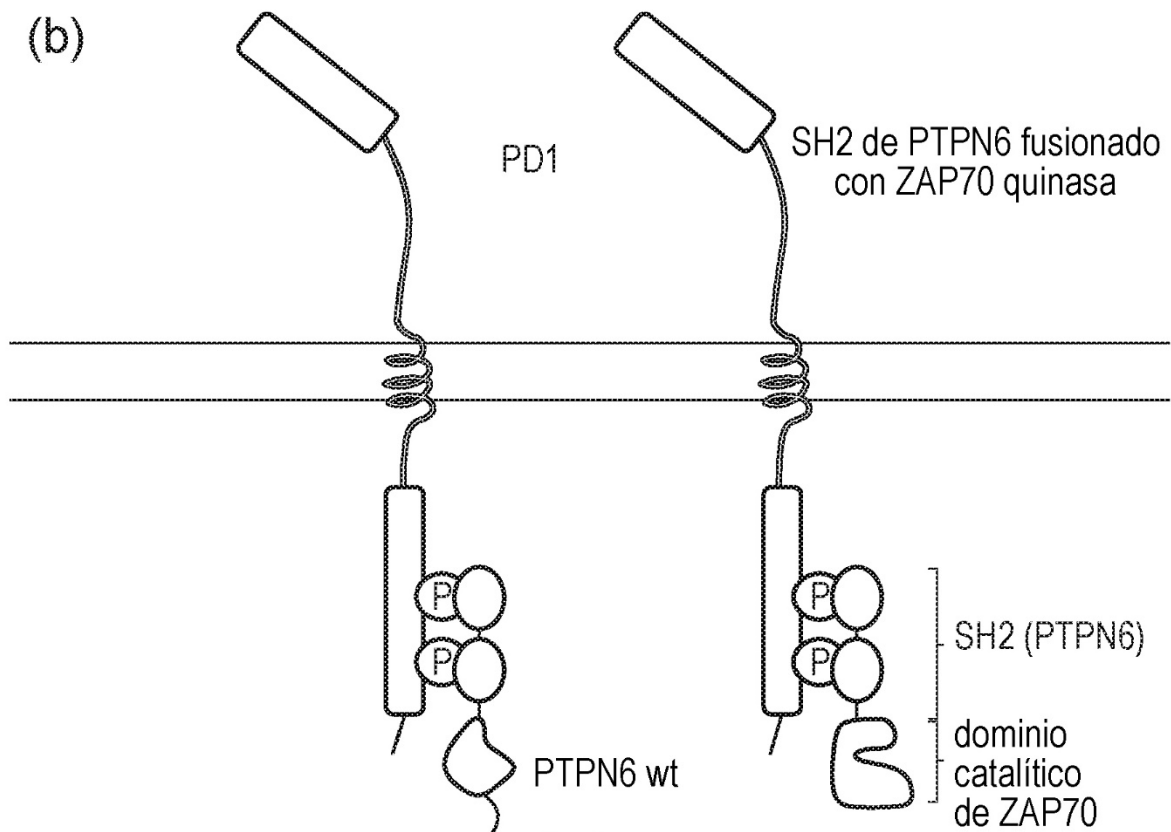
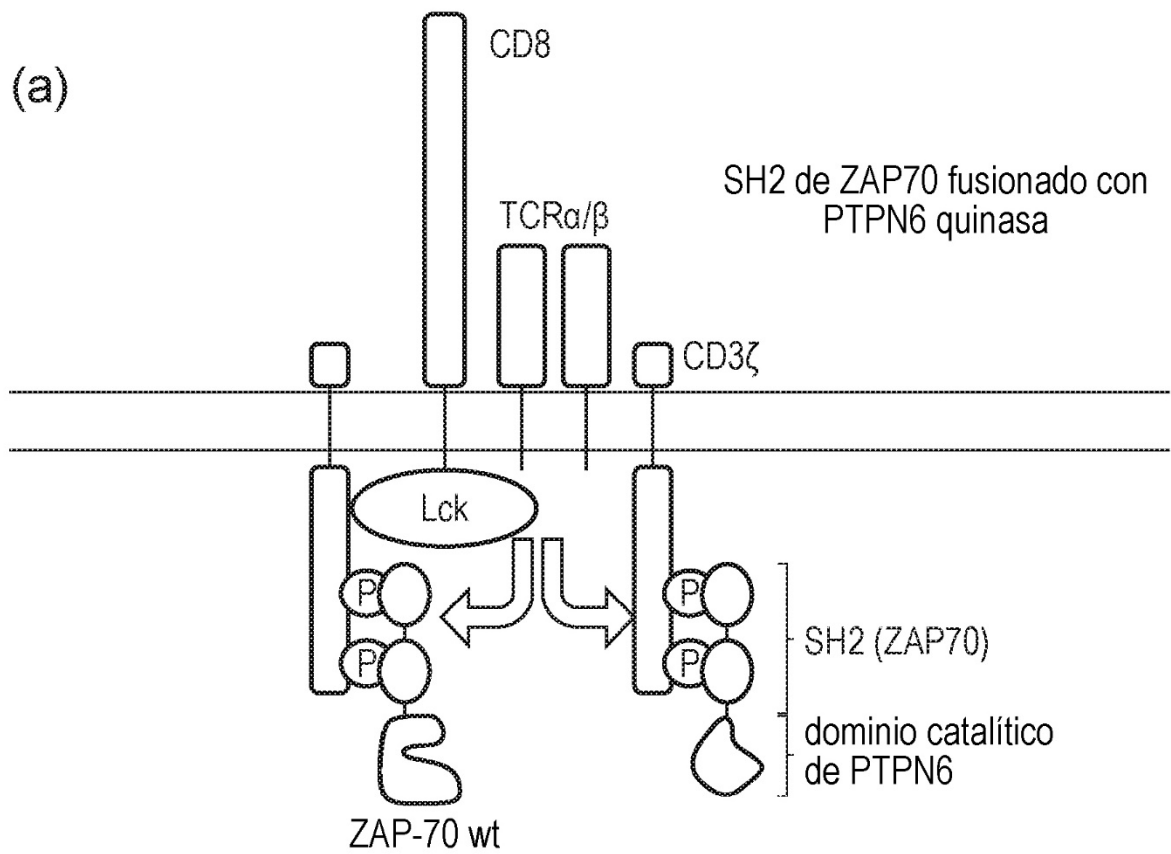


FIG. 3

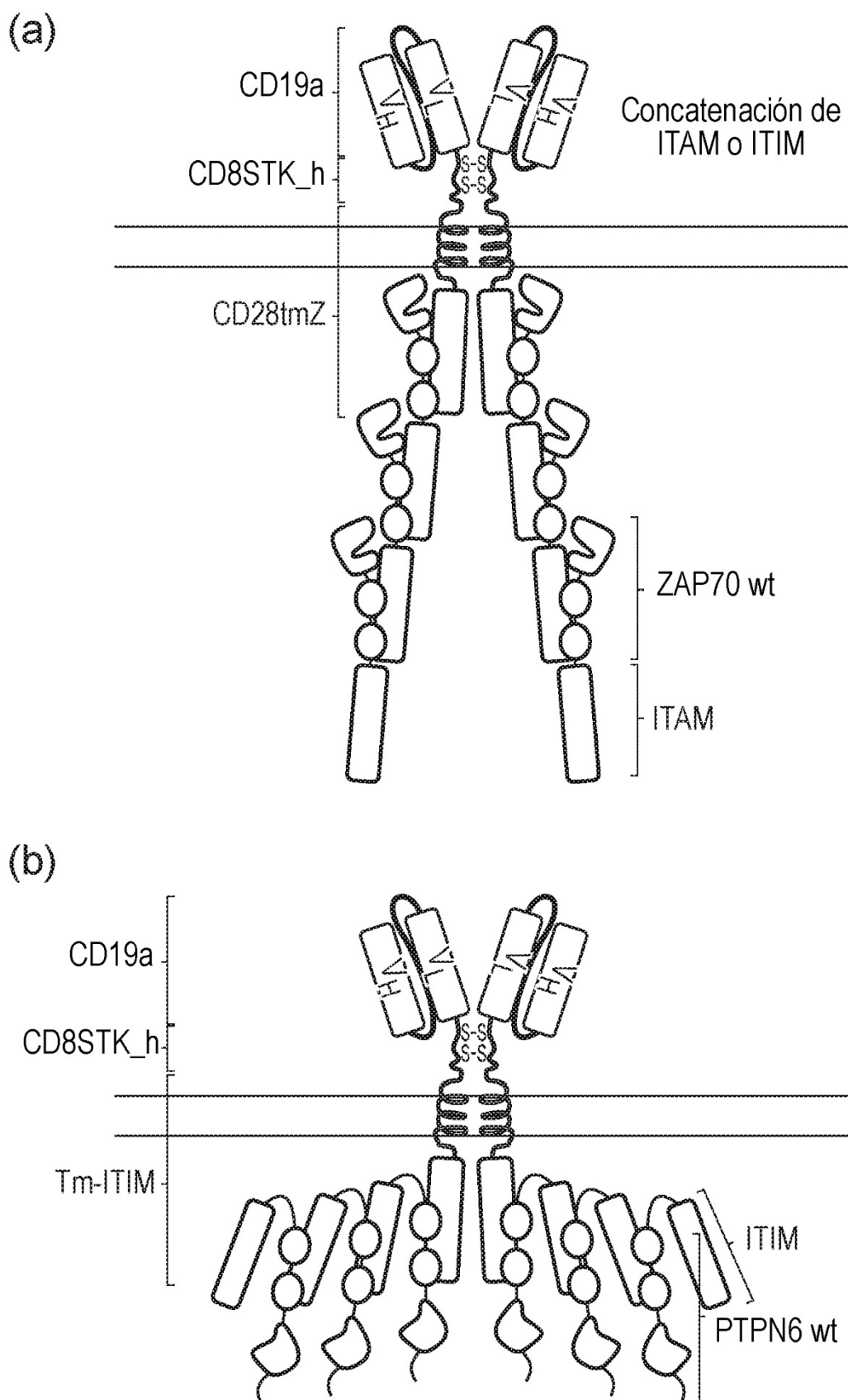


FIG. 4

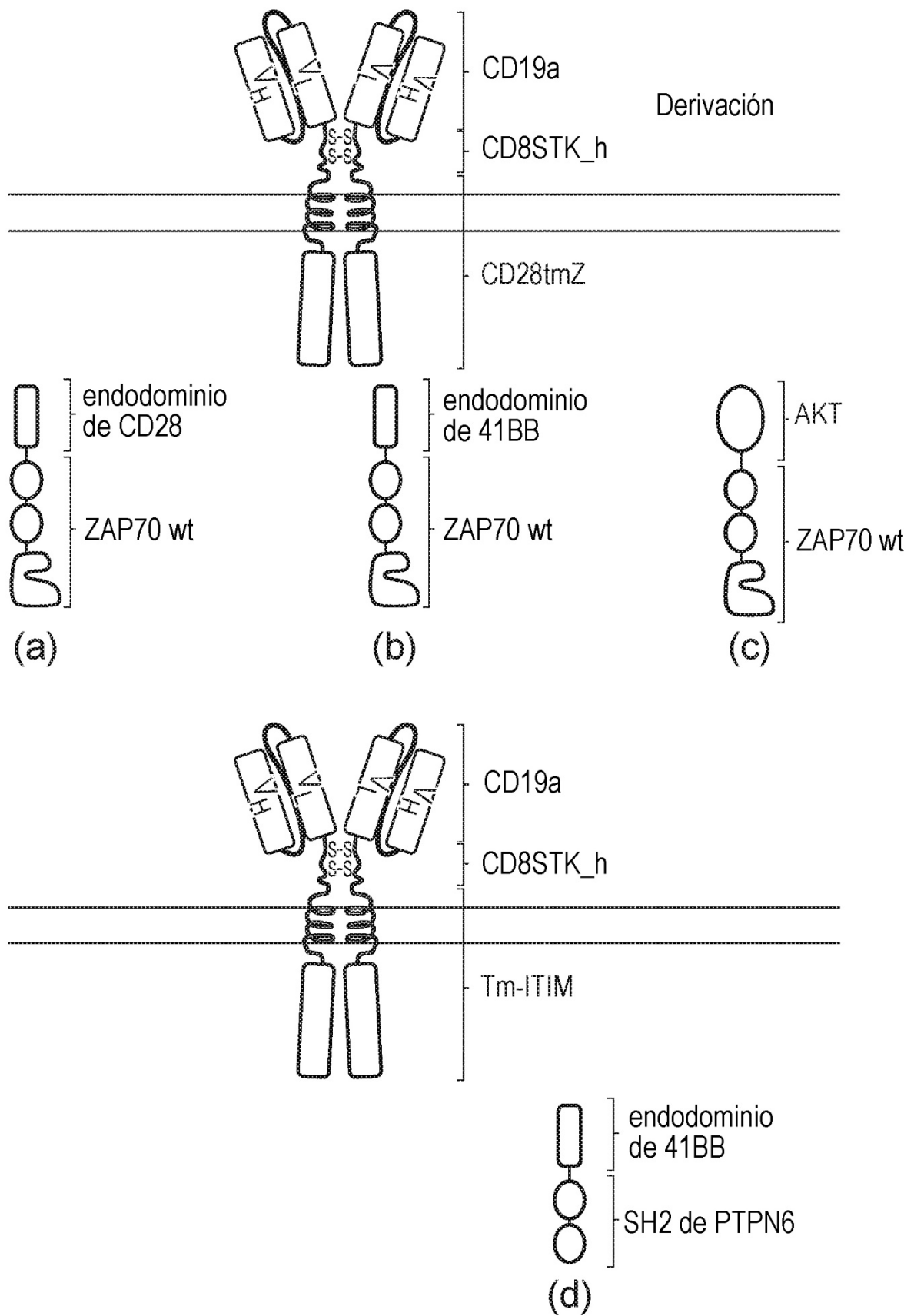


FIG. 5

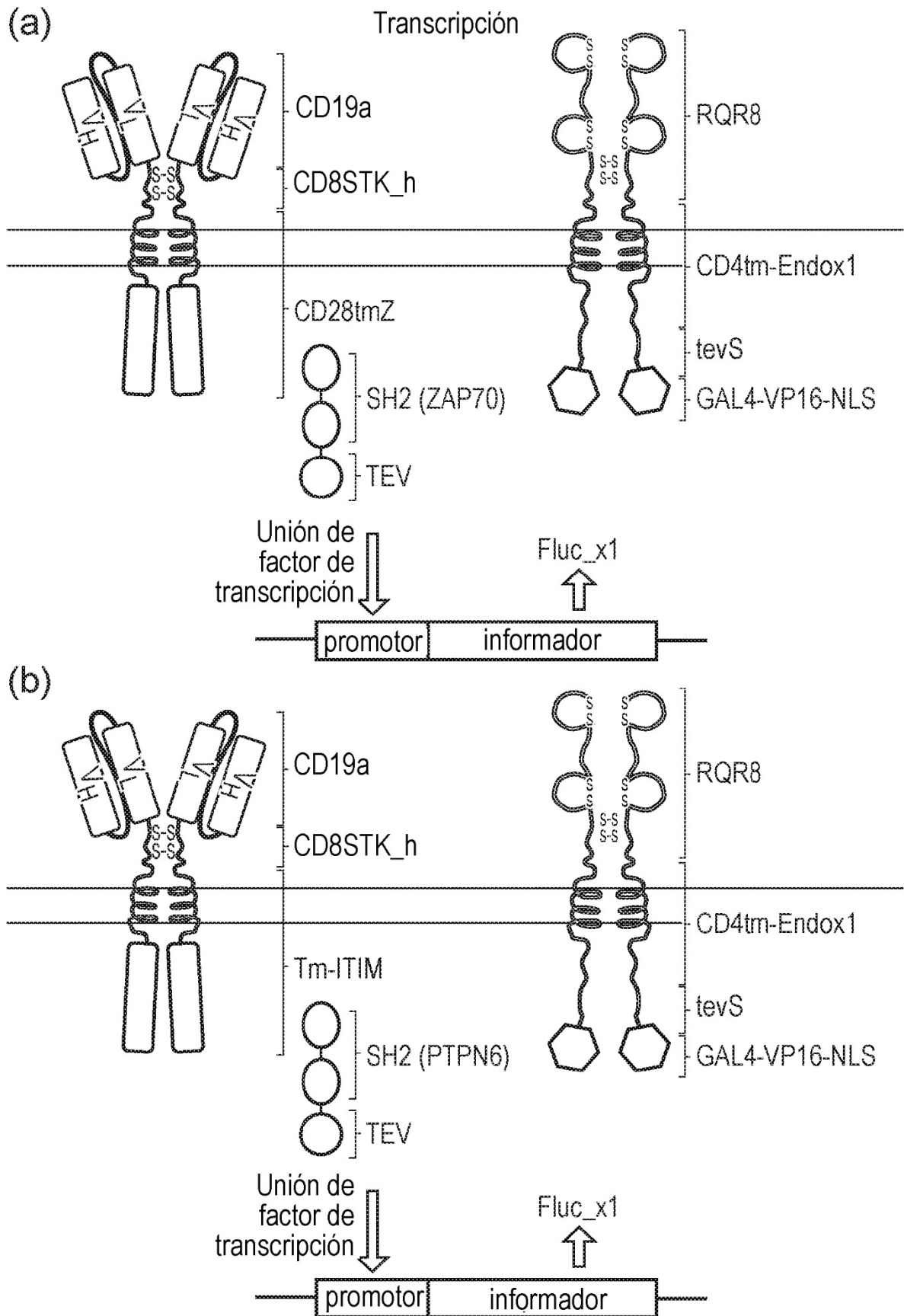


FIG. 6

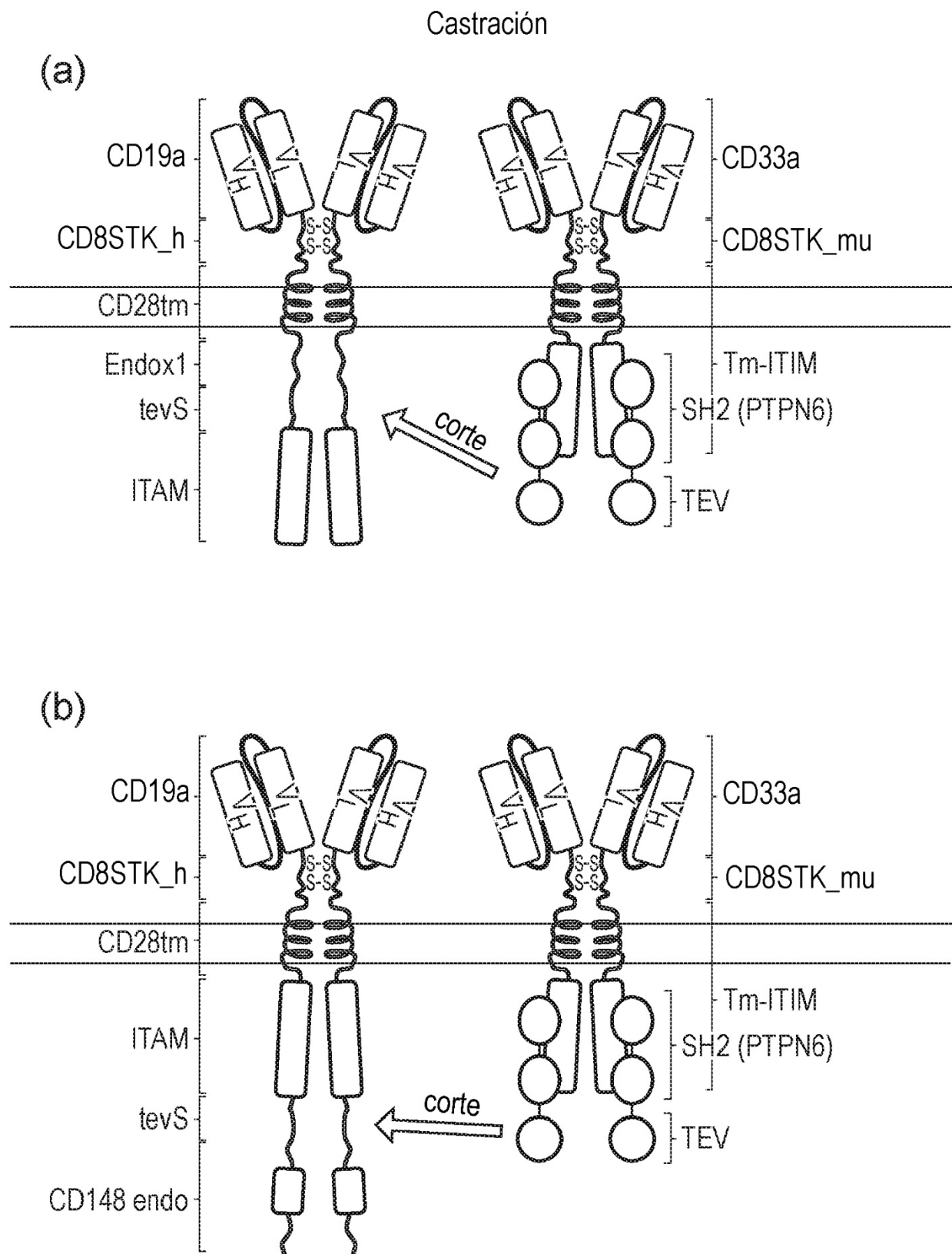


FIG. 7

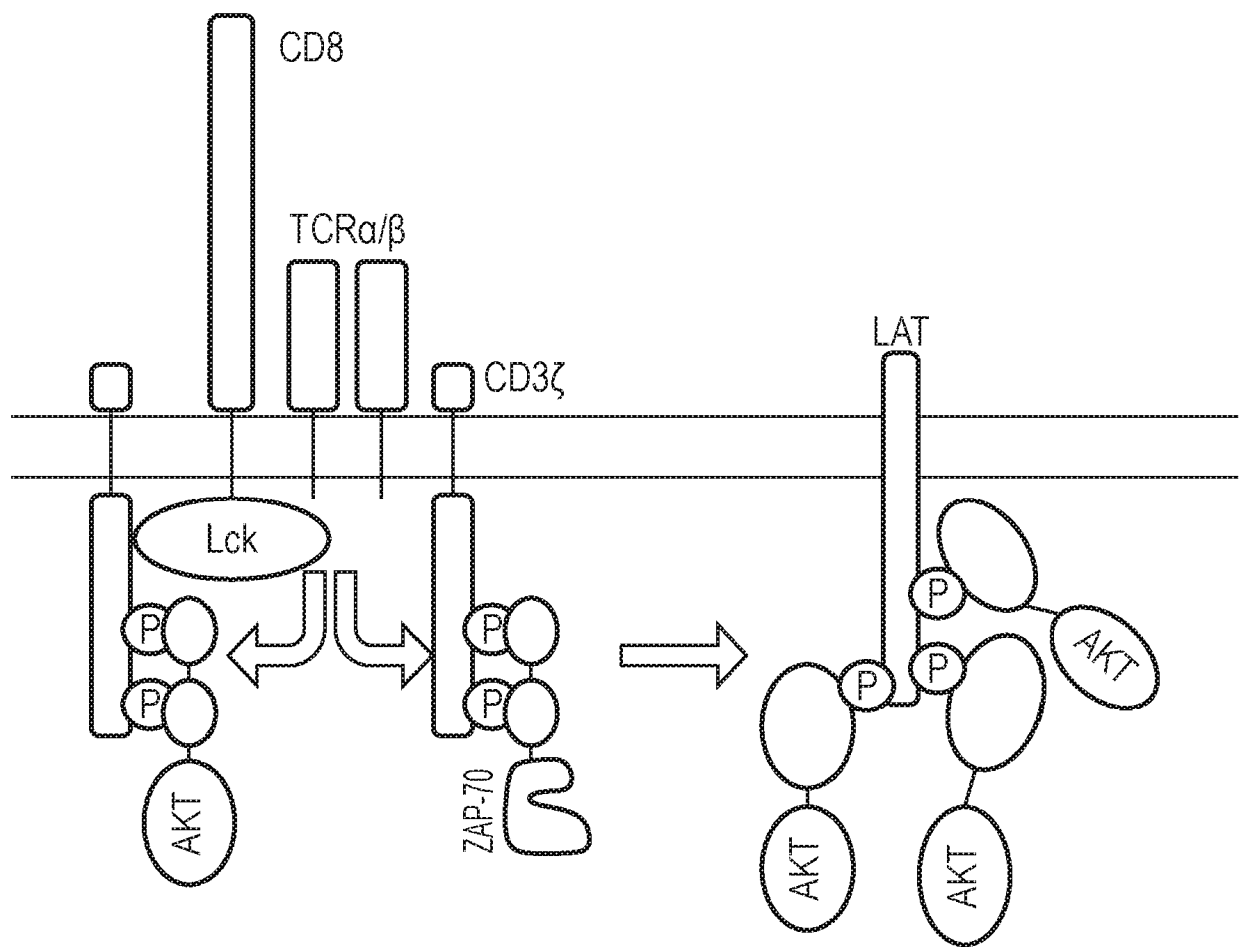


FIG. 8

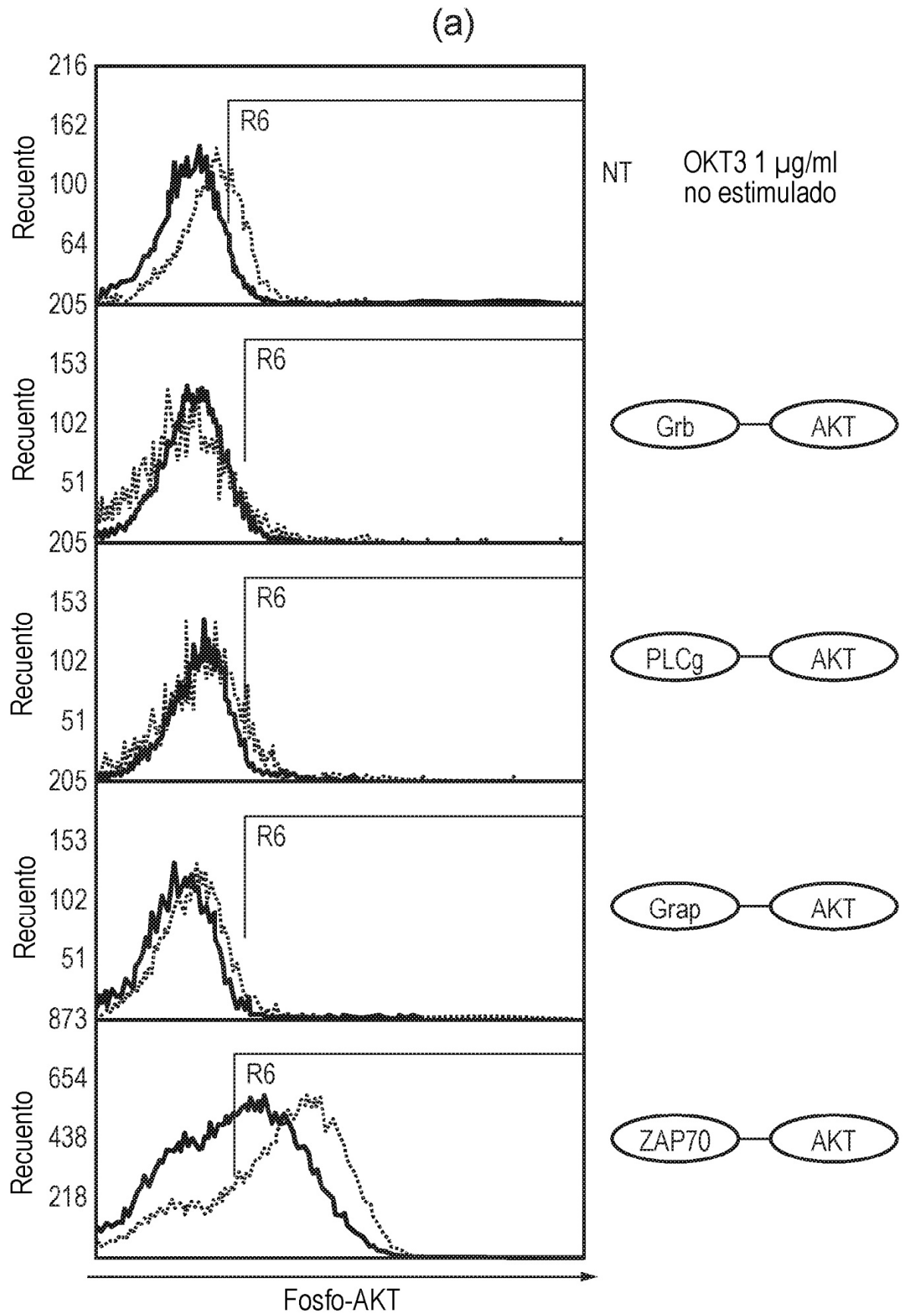


FIG. 9

(b)

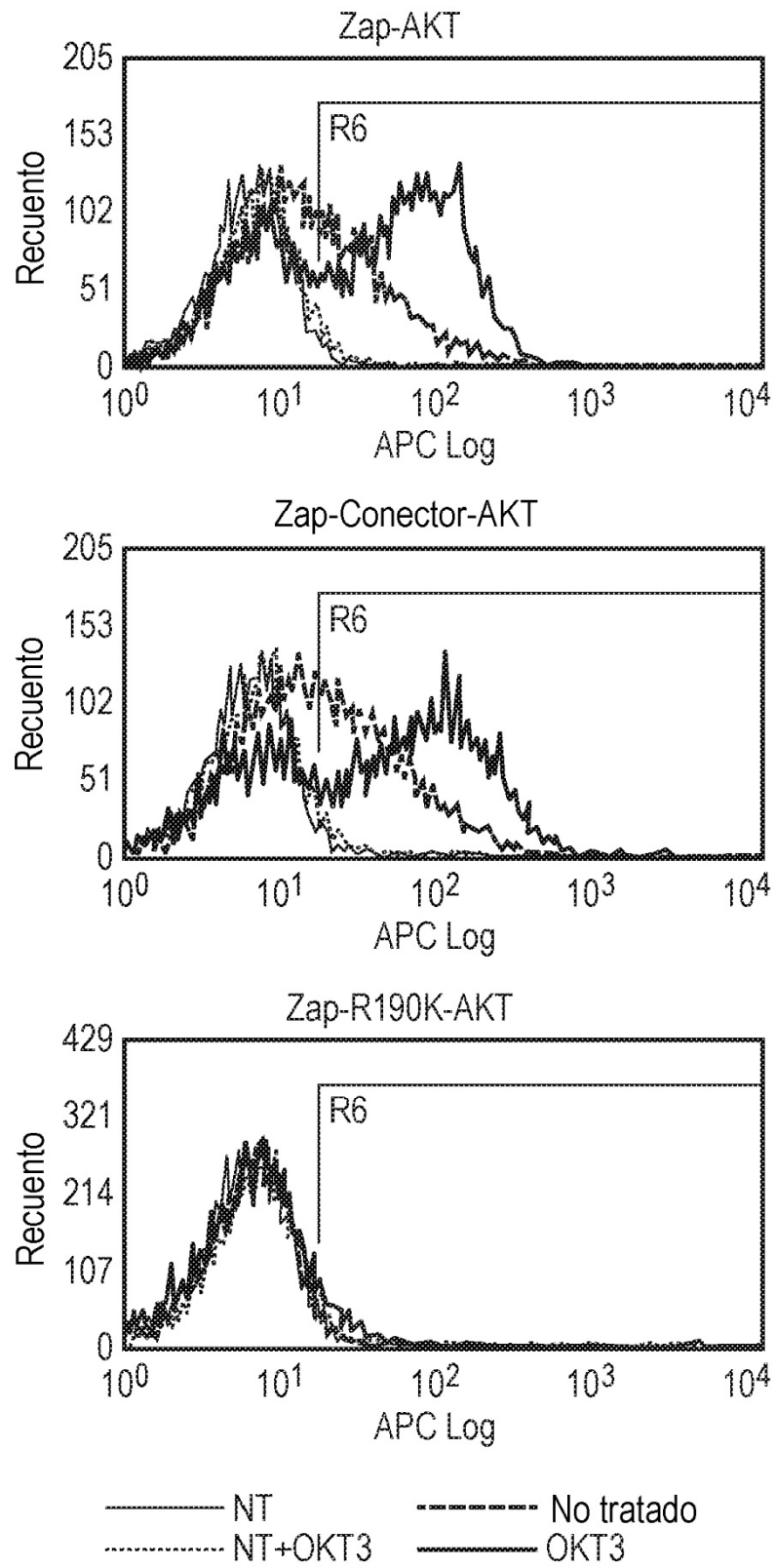
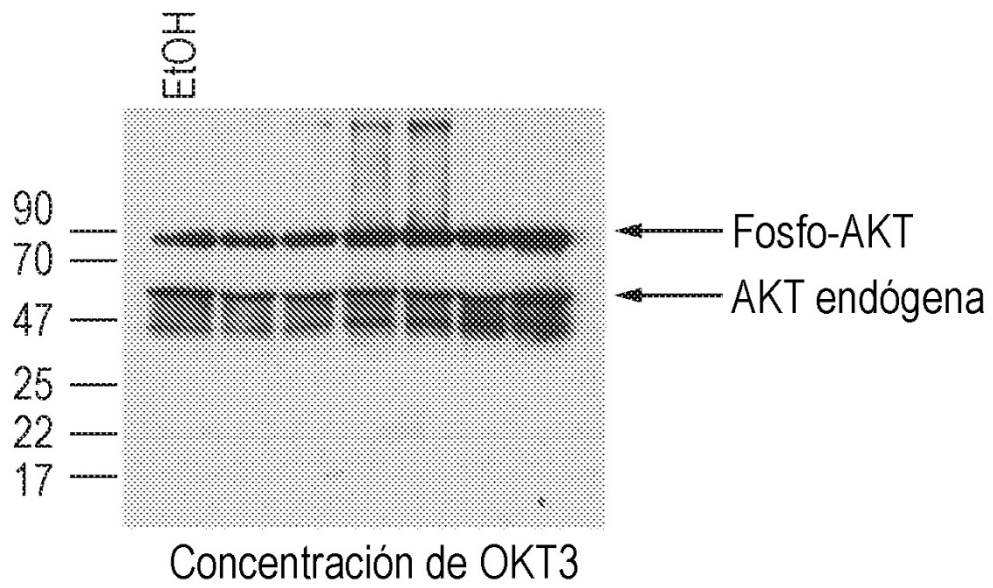


FIG. 9 (continuación)

(a)



(b)

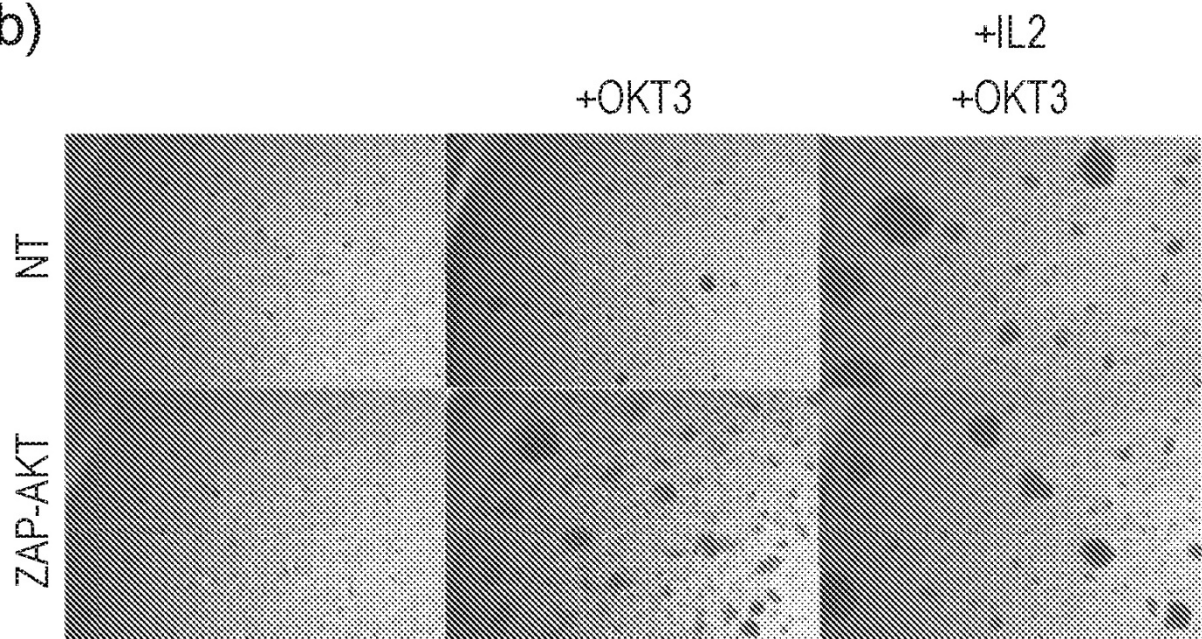


FIG. 10

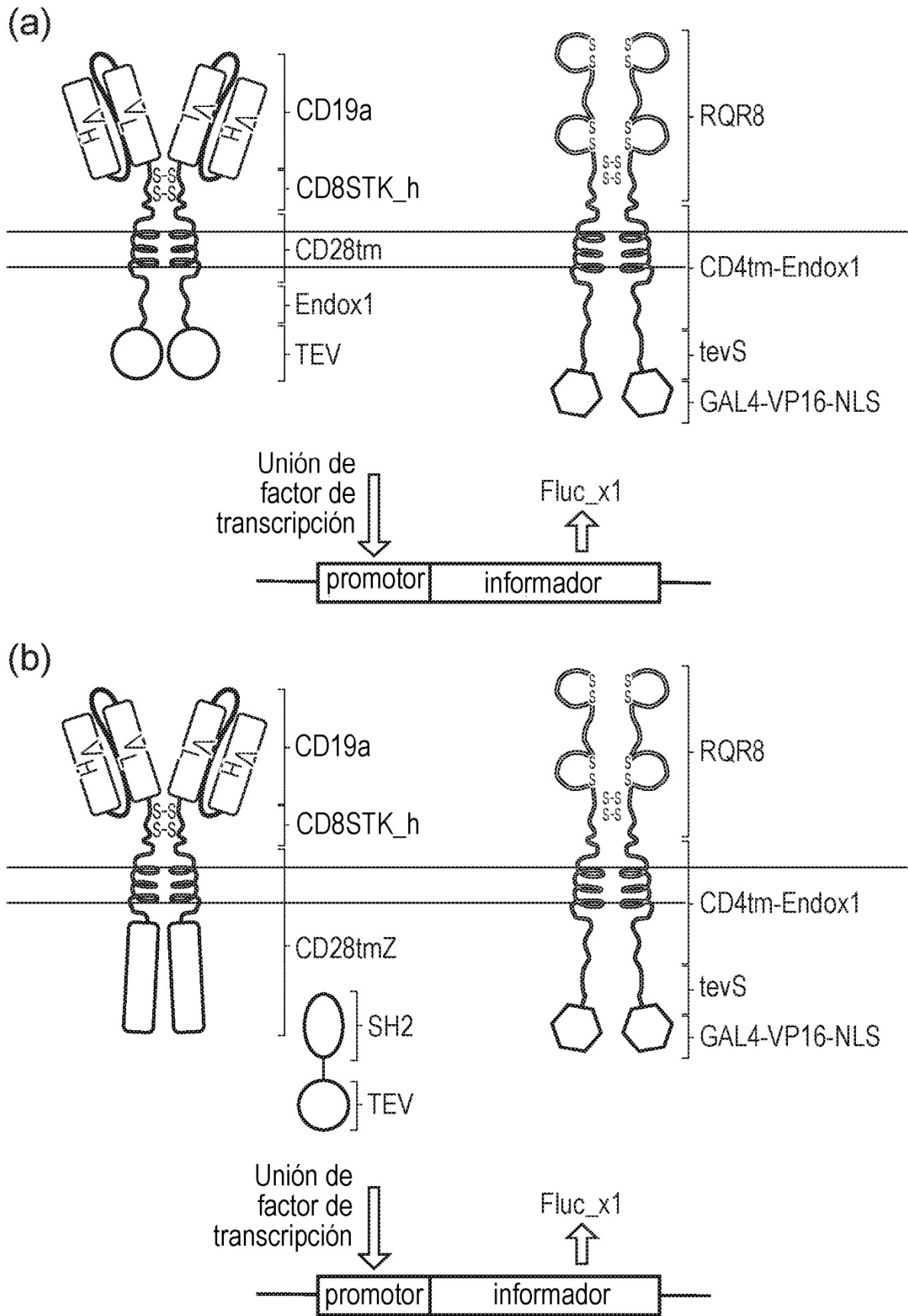
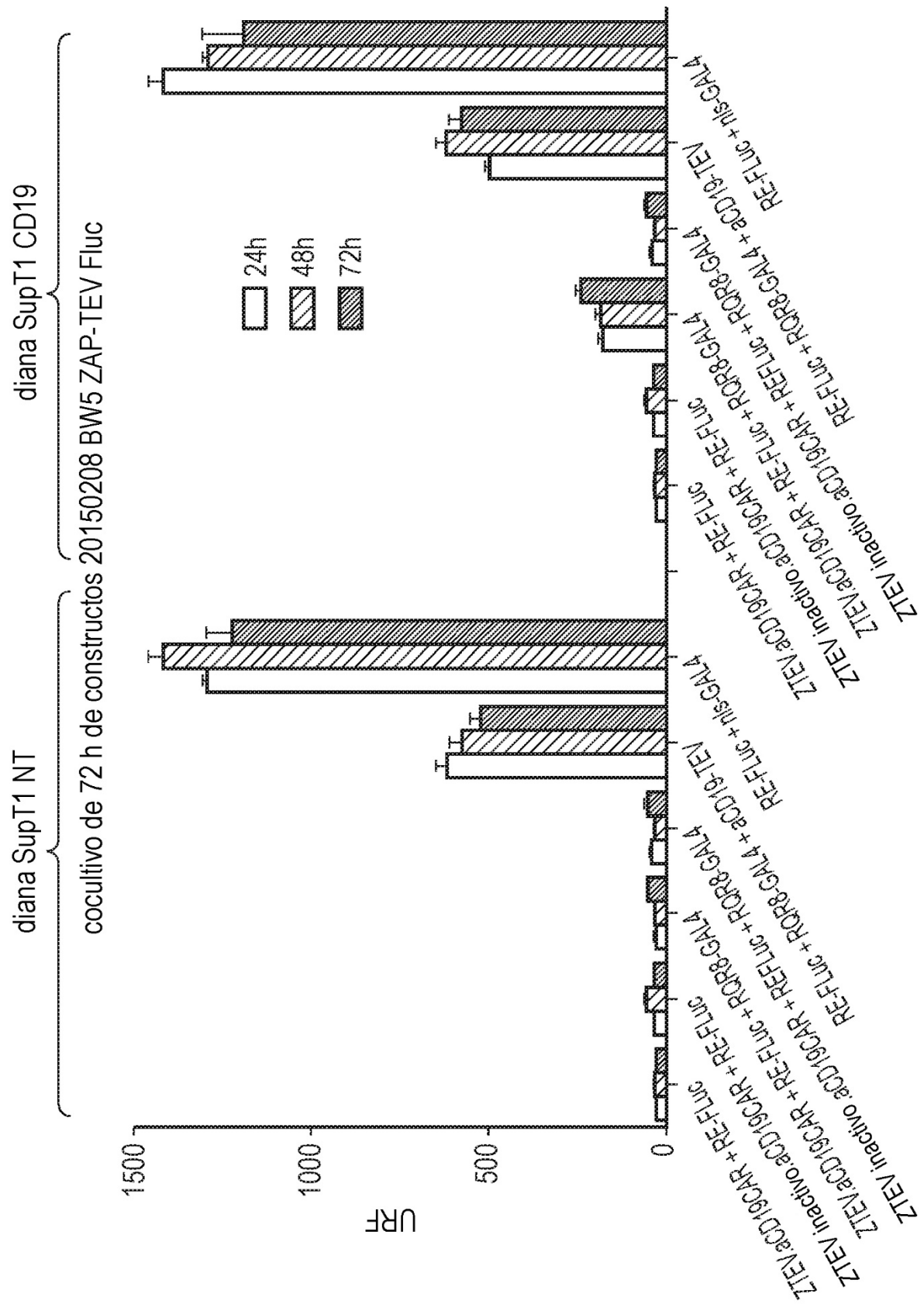
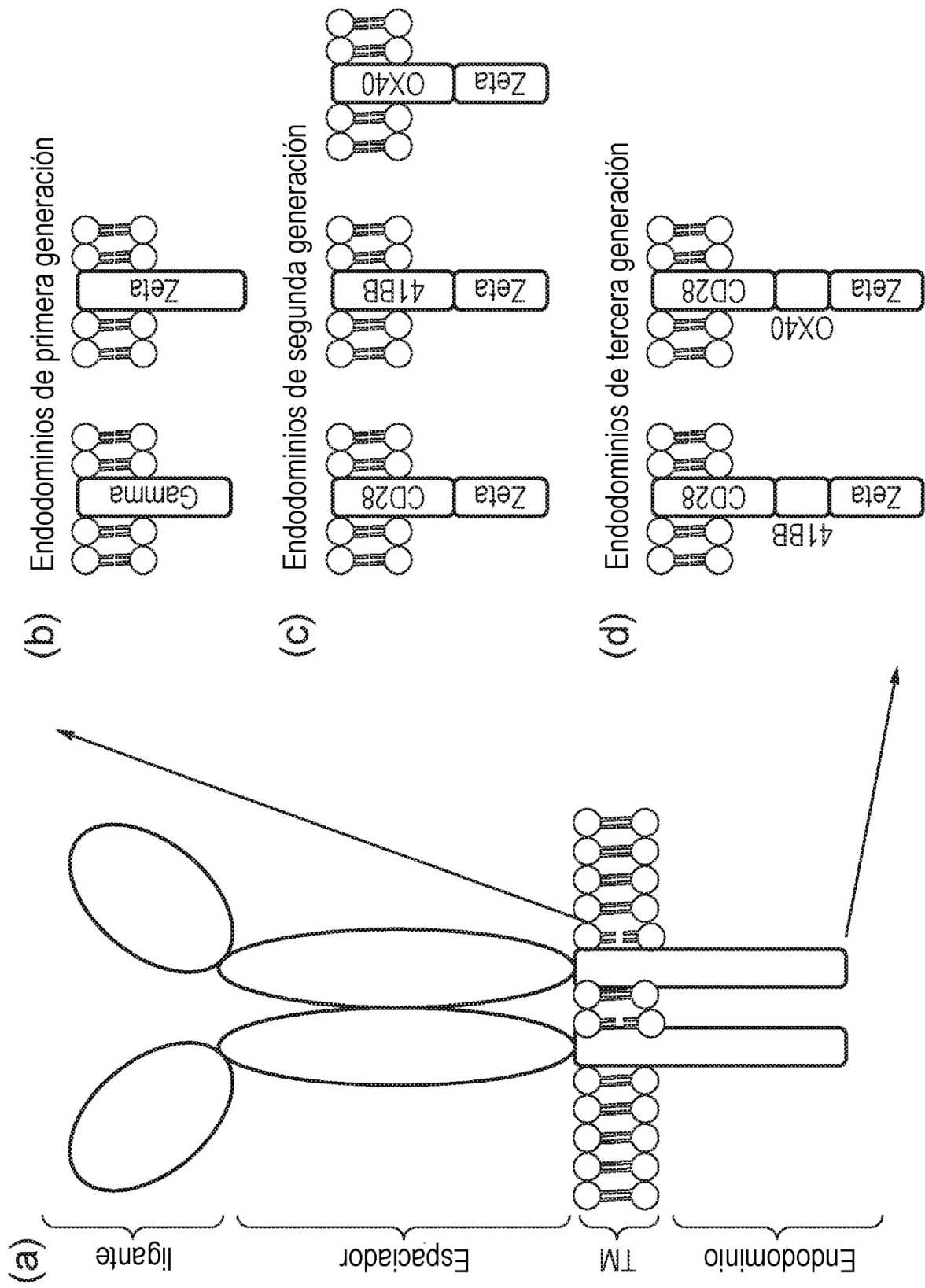


FIG. 11



12
G
L



DPZ - ZAP70 quinasa

>ZETA-ZAP (SEC ID nº 14)

MRRVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNGRREEYDVLDRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKHGDLGYOGLSTATKDTYDALHMQALPPSSGGGGSGGGSGGGSGGG
GSMPPDPAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTY
AIAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEAL
EQAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGDKFLLRPRKEQGTALSLIYGKTVYH
YLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAHPSTLTHPQR
RIDTLNSDGYTPARITSPDKPRMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKFLKRDNLLIADIELGCGNFGSVRQ
GVYRMRKKQIDVAIKVLKQGTAKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGP
LHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDS
YYTARSAGKWPLKWAYPECINFRKFSRSDVWSYGVMTMWEALSYGQKPYKKMKGPEVMAFIEQGKRM
ECPPECPPELYALMSDCWIYKWEDRPDLTVEQRMACYSLASKVEGPPGSTQKAEAAACA

MRE - endodominio CD3Zeta

SGG - Conector

MPD - ZAP70 de longitud completa

> PD1_endo-PTPN6 (SEC ID nº 25)

MTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGEIDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPR
SAQPLRPEDGHCSWPLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMVRWFHRDLGLDAETLLKGRGVHGSFLA
RPSRKNQGDVSLVRVGDQVTHIRIIONSGDFYDLYGGEKFATLTVEYTTQQQGVLODRDGTIIHLKYP
NCSDPTSERWYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLRESLSQPGDFVLSVSDQPKAGPGSPLRVTHIKV
MCEGGRYTVGGLETDFSLDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLROPYYATRVNAADIENRVLELNKKQESD
KAGFWEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGNRYKNILPFDHSRVILQGRDSNIPGSDYINANYIKNQ
LLGPDENAKTYIASOGCLEATVNDFWQMAWQENS RVIVMTTREV EKGGRNKCVPYWPVGMQRAYGP
YSVTNCGEHDTEYKRLTLQVSPDLNGLIREIWHYQYLSWPDHGVPSPPGGVLSFLDQINORQESLPHA
GPIIVHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQTIQMVRAQRSGMVQTEAQYKFIYVIAQFIET
KKKLEVLQSQKGQSEYGNITYPPAMKNAHAKASRTSSKHEDVYENLHTKNKREEKVKKQRSADKEKSK
GSLKRK

MTG - endodominio de PD1

SGG - Conector

MVR - PTPN6 de longitud completa

>CD28-ZAP (SEC ID nº 40)

MRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMPPD
PAAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAIAGG
KAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIIS
QAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGDKFLLRPRKEQGTALSLIYGKTVYHYLISO
DKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAHPSTLTHPQRRIDL
NSDGYTPARITSPDKPRMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKFLKRDNLLIADIELGCGNFGSVRQGVYR
MRKKQIDVAIKVLKQGTAKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKF
LVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTA

FIG. 14 (continuación)

RSAGKWPLKWAYPECINFRKFSSRSVDVWSYGVMTWEALSYGQKPYKKMKGPEVMAFIEQGKRMECPPE
ECPPELYALMSDCWIYKWEDRPDFTLVEQRMRAICYSLASKVEGPPGSTQKAEAAACA

MRS - endodominio de CD28

SGG - Conector

MPD - ZAP70 de longitud completa

>41BB-ZAP (SEC ID nº 41)

MKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELSGGGGSGGGSGGGSGGGSGMPD
PAAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLSLGGYVLSLVHDVRFHHPPIERQLNGTYAIAGG
KAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIIS
QAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGDKFLLRPRKEQGTYSLSIYGKTVYHYLISQ
DKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKIKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPSTLTHPQRRIDTL
NSDGYTPEPARITSPDKPRMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKFLKRDNLLIADIELGCGNFGSVRQGVYR
MRKKQIDVAIKVLKQTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKF
LVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYTTA
RSAGKWPLKWAYPECINFRKFSSRSVDVWSYGVMTWEALSYGQKPYKKMKGPEVMAFIEQGKRMECPPE
ECPPELYALMSDCWIYKWEDRPDFTLVEQRMRAICYSLASKVEGPPGSTQKAEAAACA

MKR - endodominio de 41BB

SGG - Conector

MPD - ZAP70 de longitud completa

>OX40-ZAP (SEC ID nº 42)

MRDQRLPPDAHPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKSGGGSGGGSGGGSGGGSGMPDPAHLPP
FFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLSLGGYVLSLVHDVRFHHPPIERQLNGTYAIAGGKAHCGP
AELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQAPQV
EKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGDKFLLRPRKEQGTYSLSIYGKTVYHYLISQDKAGKY
CIPEGTKFDTLWQLVEYLKIKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPSTLTHPQRRIDTLNSDGYT
PEPARITSPDKPRMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKFLKRDNLLIADIELGCGNFGSVRQGVYRMRKKQ
DVAIKVLKQTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLVGKRE
EIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYTTARSAGK
WPLKWAYPECINFRKFSSRSVDVWSYGVMTWEALSYGQKPYKKMKGPEVMAFIEQGKRMECPPECPPE
LYALMSDCWIYKWEDRPDFTLVEQRMRAICYSLASKVEGPPGSTQKAEAAACA

MRD - endodominio de OX40

SGG - Conector

MPD - ZAP70 de longitud completa

>CD28-PTPN6_SH2 (SEC ID nº 43)

MRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
WVHRDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFATLT
ELVEYYTQQQGVLDQDRDGTIIHLKYPLNCSPTSERWYHGHMSGGOAETLLQAKGEPWTFVLRESLSQP
GDFVLSVLSQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETDFSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLROPY

FIG. 14 (continuación)

MRS - endodominio de CD28

SGG - Conector

MVR-extremo aminoterminal de dominio SH2 de PTPN6

>41BB-PTPN6_SH2 (SEC ID n° 44)

MKRGRKKLLYFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCELSGGGSGGGSGGGSGGGSGMVR
 WFHRDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFATLT
 ELVEYYTQQQGVLQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVLRESLSQP
 GDFVLSVLSQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETDFSILTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPY

IMKRI - endodominio de 41BB

SGG - Conector

MVR-extremo aminoterminal de dominio SH2 de PTPN6

>OX40-PTPN6 SH2 (SEC ID n° 45)

MRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKISGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSMVRWFHRD
LSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNNQGFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFATLTVEYY
TQQQGVLLQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFVRESLSQPGDFVL
SVLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETFDSLTLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPY

MRD-endodominio de OX40

SGG - Conector

MVR - extremo aminoterminal de dominio SH2 de PTPN6

>ZAP SH2-AKT (SEC ID n° 47)

MPDPA AHL PFFYGSISR AEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLSLGGYVLSLVHVDVRFHHFPIERQLNGTYAL
AGGKAHC GPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRP SGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQ TWKLEGEALE
QAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQT DGKFL RPRKEQGT YALS LIYGKTVYHY
LISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLK LKADGLIYCLKEACPSSASNASGAAAPTLP AHPSTLTHPAEE
MEVSLAKPKHRVTMNEFEYLKLLGKGTFGKVLVKEKATGRYYAMKILKKEVIVAKDEVAHTLTENRVLQN
SRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVSEDRARFYGA EIVSALDY LHSEKNVVYRDLK
LENLMLDKDGHIKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTP EYLAPEVLEDNDYGRAVDWWGLGVVMYEMM
CGRLPFYNQDHEKLFELIMEEIRFPRTLGP EAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAGI VWQ
HVYEKKLSPPFKPQVTS ETDTRYFDEEFTAQM IITPPDQDDSMECVDSERRPHFPQFSYSASGTA

MPD - dominio SH2 de ZAP70

AKT - quinasa AKT

>ZAP SH2-L-AKT (SEC ID n° 48)

fusionado mediante un conector

MPDPA AHL PFFYGSISRAEAE EHLKLAGMADGLFLLRQCLSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAF
AGGKAHC GP AELCEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALE
QAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEARKLYSGAQT DGKFLLRPRKEQGTALSLIYGKTVYHY
LISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLK LKADGLIYCLKEACPSSASNASGAAAPTLP AHPSTLTHPSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSAEEMEVS LAKPKHRVTMNEFEYLLKGKGTGKVILVKEKATGRYYAMKIL

FIG. 14 (continuación)

KKEVIVAKDEVAHTLTENRVLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSEDRARF
YGAIVSALDYHSEKNVYRDLENLMMDKDGHIKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTPEYLAPEVLED
NDYGRAVDWWGLGVVMMYEMMCGRLPFYNQDHEKLFELIMEEIRFPRTLGPPEAKSLLSGLLKDPKQR
LGGGSEDAKEIMQHRFFAGIVWQHVEKKLSPFPKQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSMCE
VDSERRPHFPQFSYSASGTA

MPD - dominio SH2 de ZAP70

SGG - Conector

AEH - dominio de quinasa AKT

>ZAPnf-AKT (SEC ID nº 49)

MPDPAAHLPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAE
AGGKAHCAPAECEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTKLEGEALE
QAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLKPRKEQGTALSLYIGKTVYHY
LISQDKAGKYCIPEGTKFDLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPSTLTHPAEE
MEVSLAKPKHRVTMNEFEYLKLLGKGTGKVLVKEATGRYAMKILKKEVIVAKDEVAHTLTENRVLQ
SRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSEDRARFYGAIVSALDYHSEKNVYRDLE
LENLMMDKDGHIKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWWGLGVVMMYEMM
CGRLPFYNQDHEKLFELIMEEIRFPRTLGPPEAKSLLSGLLKDPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAGIVWQ
HVEYKKLSPFPKQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSMCEVDSERRPHFPQFSYSASGTA

MPD - ZAP70 mutado para ser no funcional

AEH - quinasa AKT

>ZAP SH2-TEV (SEC ID nº 53)

MPDPAAHLPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAE
AGGKAHCAPAECEFYSRDPDGLPCNLKPCNRPSGLEPQPGVDFCLRDAMVRDYVRQTKLEGEALE
QAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLKPRKEQGTALSLYIGKTVYHY
LISQDKAGKYCIPEGTKFDLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPSTLTHPSGG
GGSGGGSGGGSGGGGSLFKGPRDYNPISSTICHLTNESDGHHTSLYIGIGFPIITNKHLFRRNNGTU
LVQSLHGVFKVKNNTTLQQLHIDGRDMIIIRMPKDFPPFPQKLKREPQREERICLVTTNFQTKSMSSMVS
DTCTFPSSDGIFWKHWIQTGQCGSPLVSTRDGFIVGIHSASNFTNTNNYFTSVPKNFMELLTNQEAQ
QWVSGWRLNADSVLWGGHKVFMSPKEEPFQPVKEATQLMNELVYSQ

MPD - dominio SH2 de ZAP70

SLF - proteasa del TEV

>PTPN6 SH2-TEV (SEC ID nº 54)

MVRWFHRDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNGDFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKR
ATLTVELVEYYTQQQGVLDQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSGGQAETLLOAKGEPWTLVRES
LSQPGDFVLSVSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETDFSLDLVEHFKKTGIEASGAFVYU
RQPYYSGGGGSLFKGPRDYNPISSTICHLTNESDGHHTSLYIGIGFPIITNKHLFRRNNGTLLVQSLHGV
KVKNTTLQQLHIDGRDMIIIRMPKDFPPFPQKLKREPQREERICLVTTNFQTKSMSSMVS
DTCTFPSSDGIFWKHWIQTGQCGSPLVSTRDGFIVGIHSASNFTNTNNYFTSVPKNFMELLTNQEAQ
QWVSGWRLNADSVLWGGHKVFMSPKEEPFQPVKEATQLMNELVYSQ

FIG. 14 (continuación)

MVR - dominio SH2 de PTPN6
SGG - Conector
SLF - proteasa del TEV

>RQR8-CD4tm-Endox1-tevS-VP16-GAL4 (SEC ID n° 55)

MGTSLLCWMLCCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLG
 SGGGGSPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMALIVLGGVAGLLFIGLGIFFC
 VRCRHHRRRQAERMAQIKRVVSEKKTAAQAPHRFQKTCSPISGGGGSENLYFQMPKKKRKVAPPTDVSLGD
 ELHLDGEDVAMAHADALDDFDLMDLGDGDSPPGFTPHDSAPYGALDMADFEFEQMFTDALGIDEYG
 GSGGGSMQILVASDATMKLLSIEQACDICRLKKLCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLT
 EVESRLERLEQLFLIFPREDLDMILKMDSLODIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHR
 SATSSSEESSNKGQRQLTY

MGT - dominio RQR8
RCR - CD4tm
SGG - Conector
ENL - sitio de reconocimiento del TEV
PKK - VP16
MQ - GAL4

>aCD33-CD8STK_mu-PD1_tm_endo (SEC ID n° 56)

MAVPTQVLGLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDVITITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYD
 ITNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLOPEDFATYYCQHYKNYPLTFGGGKLEIKRSGGGGSGGGGSGG
 GGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGS
 IYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGGGLTVTVSSMDPAIT
 ITKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYGVVGGGLGSLVLLVWVLAVICSRAAR
 GTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSDYGELDFQWREKTPPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGS
 ADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

MAV - anti-CD33
ITI - tallo de CD8alfa de ratón
MGV - endodominio de PD-1

>aCD19-CD8STK_h-CD28tm-Endox1-tevS-Z (SEC ID n° 57)

RAQ contra CD19 con endodominio Zeta escindible

MSLPVTALLPLALLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQQKPDGTVKLLIYHT
 SRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQOGNTLPYTFGGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGG
 GSGGGGSEVKLOESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSAL
 KSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDAIYYCAKHYGGSYAMDYWGOGTSVTVSSDPTTTPAPRPPTP
 APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIWVLLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRCRHHRRRQ
 AERMAQIKRVVSEKKTAAQAPHRFQKTCSPISGGGGSENLYFQMRVKFSRSADAPAYQOGQNLQYNEI
 NLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPOEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYC
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

FIG. 14 (continuación)

MSL - anti-CD19
 PTT - tallo de CD8alfa
 FWV - dominio transmembranal de CD28
 RCR - Endox1
 ENI - sitio de reconocimiento de TEV
 RRV - endodominio CD3 zeta

>aCD19-CD8STK_h-CD28tmZ-tevS-CD148endo (SEC ID nº 58)

RAQ contra CD19 con endodominio Zeta y dominio catalítico de CD148 escindible

MSLPVTALLPLALLHAARPDQMOTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQOKPDGTVKLLIYHT
 SRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQOQNTLPYTFGGGKLEITKAGGGGSGGGGSGGG
 GSGGGGSEVKLOESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSSETTYNSAL
 KSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSDPTTTPAPRPPTP
 APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSA
 DAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPENMGKPRRNPOEGLYNELQDKMAEAYSEIG
 MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPRENLYFQMAVFGCIFGALVIVTVGGFIFWRKK
 RKDAKNNNEVSFSQIKPKSKLIRVENFEAYFKKQQAQDSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNR
 YNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGPLNLTLDKDFWRMVWEKNVYAIIMLT
 KCVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSSEHPLRQFHFTSWPDHGV
 PDITDLINFRYLVRDYMKSPPESPILVHCSAGVGRTGTGFIADRLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPL
 MVQTEDQYVFLNQCVLDIRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA

MSL - anti-CD19
 PTT - tallo de CD8-alfa
 FWV - dominio transmembranal de CD28
 RRV - endodominio CD3 zeta
 ENI - sitio de reconocimiento del TEV
 AVF - endodominio de CD148

>SHP1-ZAP70 quinasa de SH2 dual (SEC ID nº 61)

WFHPNITGVEAENLLITRGVDGSFLARPSKSNPGDFILSVRRNGAVTHIKIONTGDDYYDLYG
 GEKFATLAELVQYYMEHHGOLKEKNGDVIELKYPLNCADPTSERWFHGHLSGKEAEKLLTE
 KGKHGSFLVRESQSHPGDFVLSVRTGDDKGESNDGKSKVTHVMIRCOELKYDVGGGERFD
 SLTDLVEHYKKNPMVETLGTVLQKQPLNTRINPNSSASNASGAAAPTLPAPHPSTLTHPQR
 RIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKFLKRDNLITADIELGC
 GNFGSVRQGVYRMRKKQIDVAIKVLKQGTAKDTEEMMREAQIMHOLDNPYIVRLIGVCOAE
 ALMLVMEMAGGGPLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHGVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLL
 VNRHYAKISDFGLSKALGADDSYTTARSAGKWPLKWAYPECINFRKFSSRSQVWSYGVMT
 WEALSYGQKPYKKMKGPEVMAFIEQGRMECPPECPELYALMSDCWYKWEDRPDLTV
 EQMRACYYSL

WFH - Primer dominio SH2 de SHP-2
 NCA - Conector
 WFH - Segundo dominio SH2 de SHP-2
 NTT - Conector
 LIA - ZAP-70 proteína quinasa

>SHP-2-Akt quinasa de SH2 dual (SEC ID nº 62)

WFHPNITGVEAENLLITRGVDGSFLARPSKSNPGDFILSVRRNGAVTHIKIONTGDDYYDLYG
 GEKFATLAELVQYYMEHHGOLKEKNGDVIELKYPLNCADPTSERWFHGHLSGKEAEKLLTE
 KGKHGSFLVRESQSHPGDFVLSVRTGDDKGESNDGKSKVTHVMIRCOELKYDVGGGERFD

FIG. 14 (continuación)

SLTDLVEHYKKNPMVETLGTVLQLKQPLNTTRINAEEMEVSLAKPKHRVTMNEFEYLKLLGK
 GTFGKVLVKEKATGRYYAMKILKKEVIVAKDEVAHTLTENRVLQNSRHPFLTALKYSFQTHD
 RLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSSEDRARFYGAEIVSALDYHSEKNVYRDLKLENLMLD
 KDGHKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWWGLGVVMYEMMC
 GRLPFYNQDHEKLFELLMEEIRFPRTLGPPEAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQH^{RF}
^{WFF}FAGIWWQHVVYEKKLSPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQM^{NTT}ITPPDQDDSMECVDSERRPHF
 PQFSYSASGTA

^{WFF} - Primer dominio SH2 de SHP-2

^{NCA} - Conector

^{WFF} - Segundo dominio SH2 de SHP-2

^{NTT} - Conector

^{FEY} - AKT proteína quinasa

^{RF} - Conector

^{AGI} - AKT AGC-quinasa C-terminal

FIG. 14 (continuación)

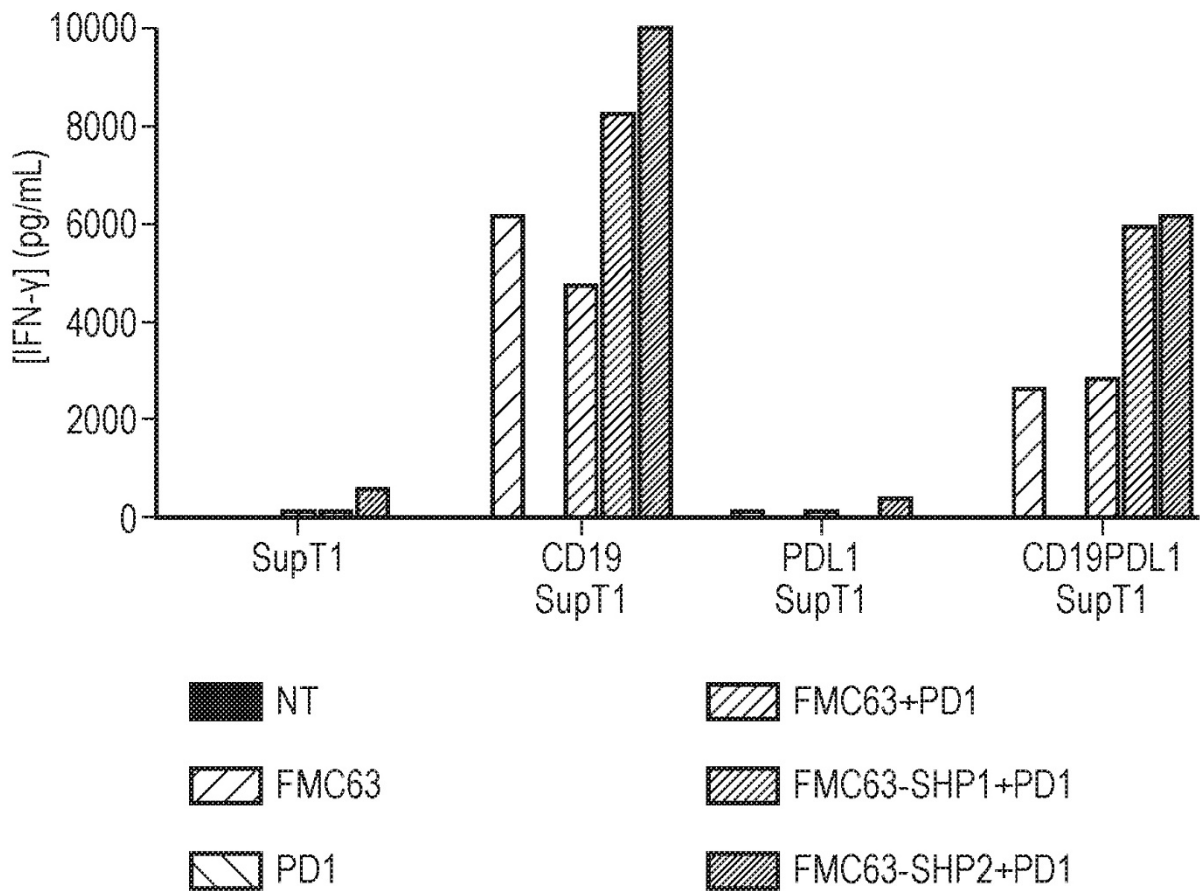


FIG. 15

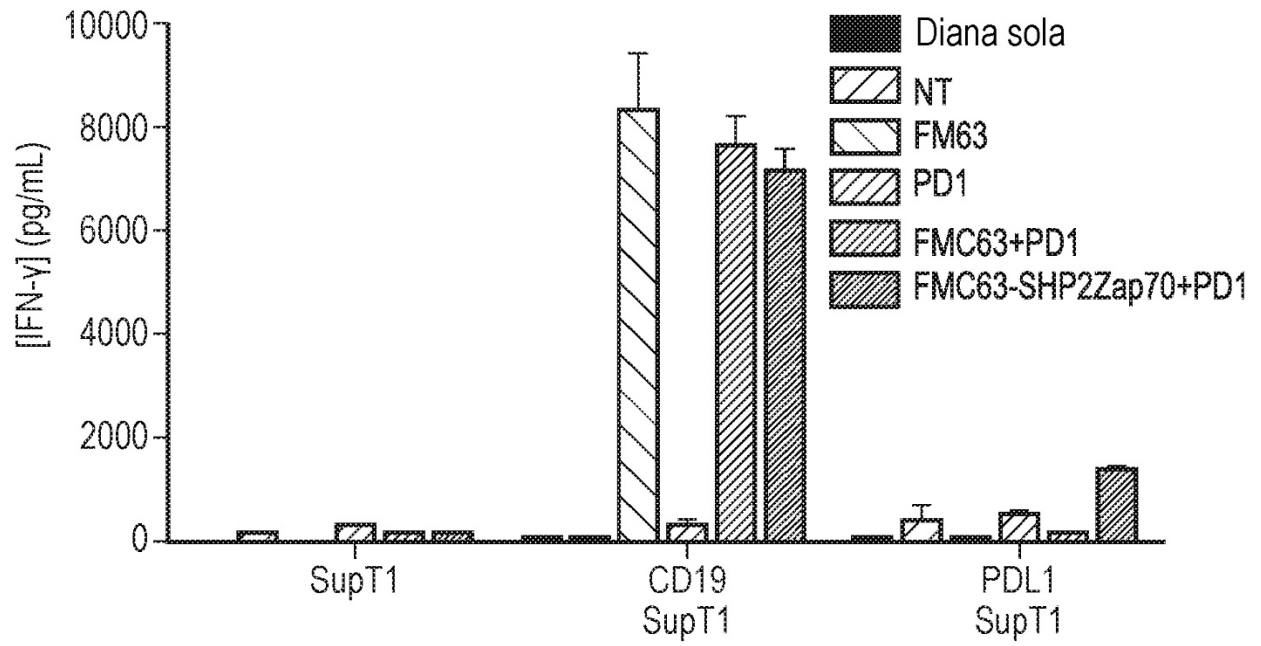


FIG. 16A

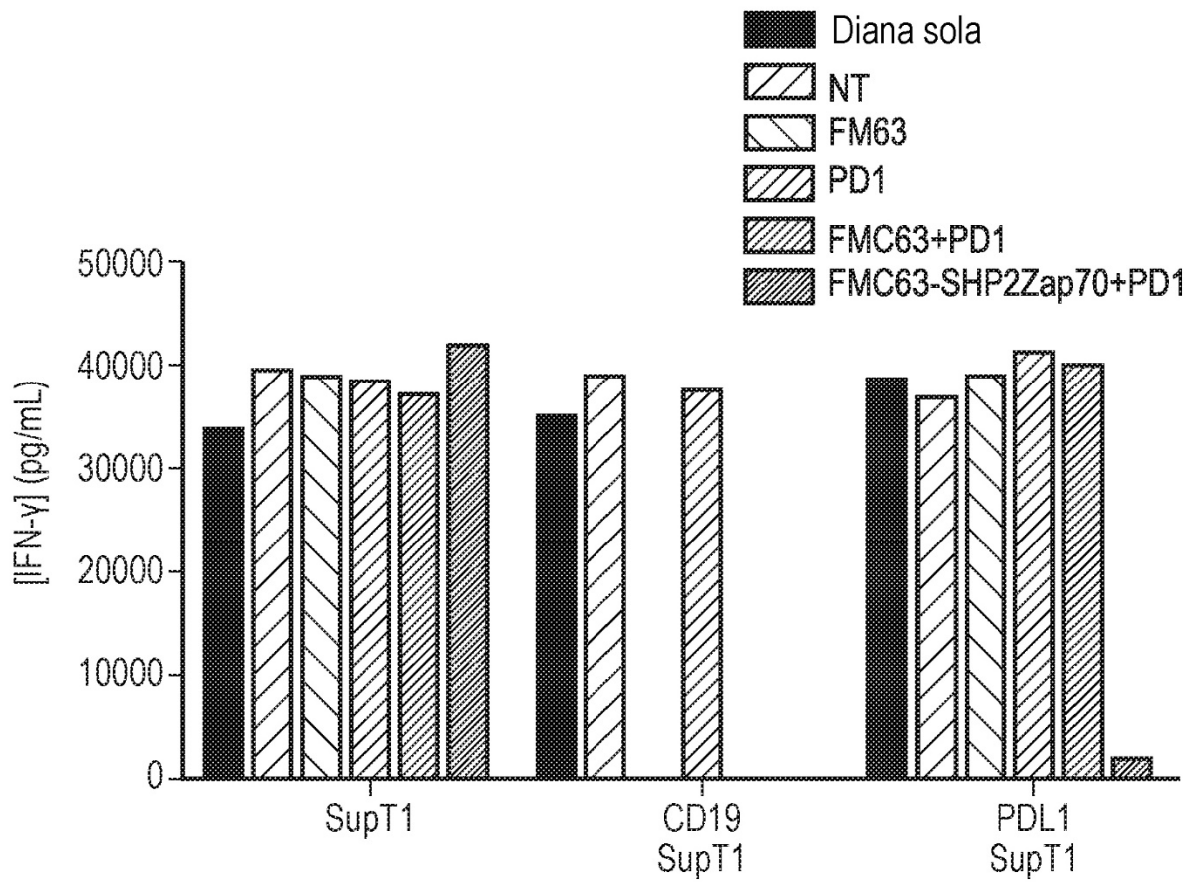


FIG. 16B