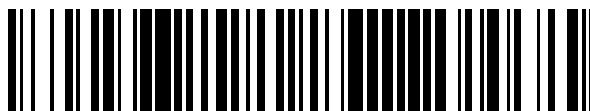


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 067**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2016 PCT/GB2016/050574**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2016 WO16139487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2016 E 16709529 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3265490**

54 Título: **Receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un dominio de unión a CD19**

30 Prioridad:

05.03.2015 GB 201503742

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

20.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PULÉ, MARTIN;
MEKKAOUI, LEILA;
AMROLIA, PERSIS;
GHORASHIAN, SARA;
KRAMER, ANNE y
CHEUNG, GORDON**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 732 067 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

Receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un dominio de unión a CD19

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une al antígeno de linfocitos B CD19 (cúmulo de diferenciación 19). Las células T que expresan dicho CAR son útiles en el tratamiento de enfermedades cancerosas como las leucemias y linfomas de células B.

10

Antecedentes de la invención

Receptores de antígenos quiméricos

15 Tradicionalmente, las células T específicas de antígeno se han generado por expansión selectiva de células T de sangre periférica nativas que son específicas para el antígeno diana. Sin embargo, es difícil y a menudo imposible seleccionar y expandir grandes cantidades de células T específicas para la mayoría de los antígenos del cáncer. La terapia génica con vectores de integración nos brinda una solución a este problema: la expresión transgénica del receptor de antígeno quimérico (CAR) permite que grandes cantidades de células T específicas de cualquier antígeno de superficie se generen fácilmente mediante la transducción de vectores virales ex vivo de una población general de células T de sangre periférica.

20

25 Las formas más comunes de estas moléculas son las fusiones de fragmentos variables de cadena única (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales que reconocen un antígeno diana, fusionado a través de un espaciador y un dominio transmembrana a un endodominio de señalización. Dichas moléculas dan como resultado la activación de la célula T en respuesta al reconocimiento por parte del scFv de su diana relacionada. Cuando las células T expresan dicho CAR, reconocen y matan a las células diana que expresan el antígeno diana. Se han desarrollado varios CAR contra los antígenos asociados a tumores, y actualmente se están realizando ensayos clínicos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer con el uso de tales células T que expresan CAR. Hasta la fecha, sin embargo, la exploración clínica principal y la posible aplicación de la terapia CAR es como tratamiento para las neoplasias malignas de células B.

30

CAR dirigido contra CD19

35 El CD19 es un antígeno de células B que se expresa muy temprano en la diferenciación de las células B y solo se pierde en la diferenciación de la célula B terminal en células plasmáticas. Por lo tanto, CD19 se expresa en todas las neoplasias malignas de células B, aparte del mieloma múltiple. No se expresa en otras poblaciones hematopoyéticas o células no hematopoyéticas y, por lo tanto, el tratamiento de este antígeno no debe causar toxicidad en la médula ósea o en órganos no hematopoyéticos. La pérdida del compartimento normal de células B se considera una toxicidad aceptable cuando se tratan neoplasias malignas linfoides, ya que aunque la terapia eficaz con células T CD19 CAR generará una aplasia de las células B, la hipogammaglobulinemia resultante puede tratarse con inmunoglobulina combinada.

40

45 El CD19 es, por lo tanto, una diana atractiva del CAR. Hasta la fecha, el principal foco clínico del campo CAR ha sido los estudios dirigidos a CD19 en cánceres de células B refractarios, como se resume en la Tabla 1.

Se han probado diferentes diseños de CAR contra CD19 en diferentes centros, como se describe en la Tabla 1:

Tabla 1. Resumen de la experiencia CAR dirigida contra CD19

Centro	Enlazador	Endodominio	Comentario
University College London	Fmc63	CD3-Zeta	Persistencia breve de bajo nivel
Memorial Sloane Kettering	SJ25C1	CD28-Zeta	Persistencia a corto plazo
NCI/KITE	Fmc63	CD28-Zeta	Bajo nivel de persistencia a largo plazo
Baylor, Centro de terapia celular y génica	Fmc63	CD3-Zeta/CD28-Zeta	Bajo nivel de persistencia a corto plazo
UPENN/Novartis	Fmc63	41BB-Zeta	Alto nivel de persistencia a largo plazo

50

La mayoría de los estudios han probado el CAR contra CD19 basado en un scFv derivado del hibridoma fmc63. Las más prometedoras han sido en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA).

Experiencia clínica con CAR contra CD19

55

La terapia con CAR dirigida contra CD19 parece ser la más efectiva en la LLA. Los primeros estudios en LLA se publicaron en la primavera de 2013, por grupos del Memorial Sloane Kettering (Brentjens, et al. (2013) Leukemia. Sci. Transl. Med. 5, 177ra38) y la Universidad de Pennsylvania. Recientemente se ha realizado un informe

actualizado de este último estudio (Maude et al. (2014) N. Engl. J. Med. 371, 1507-1517). Aquí, 25 pacientes menores de 25 años y 5 mayores de esta edad fueron tratados. El 90% logró una respuesta completa al mes, 22 de 28 casos evaluables lograron un estado negativo de ERM y la tasa de supervivencia libre de eventos de 6 meses fue del 67%. 15 pacientes no recibieron más terapia después del estudio.

Brentjens et al. (como en el caso anterior) en el caso de adultos, trató a 5 pacientes con LLA (2 con recaída refractaria, 2 con una ERM positiva y 1 que tenía una ERM negativa) con células T autólogas transducidas retrovíricamente para expresar una CAR contra CD19 incorporando un scFv derivado del hibridoma SJ25C1 y un dominio coestimulador CD28. Todos estos lograron una remisión molecular profunda, permitiendo que 4 de estos pacientes recibieran un SCT alogénico. Esta evaluación excluyó la durabilidad de las respuestas, pero las células CAR T solo fueron detectables en la sangre o en la médula ósea durante 3-8 semanas después de la infusión. El paciente que no fue trasplantado recidivó a los 90 días con enfermedad CD19+. Posteriormente, Davila et al. ((2014). Sci. Transl. Med. 6, 224ra25) han actualizado esta cohorte. 14 de 16 pacientes adultos tenían enfermedades detectables en el punto de infusión de células T CAR, a pesar de la quimioterapia de rescate y el acondicionamiento con ciclofosfamida. 14 de 16 lograron una remisión completa con o sin recuperación del recuento, incluidos 7 de 9 pacientes con evidencia morfológica de enfermedad residual detectable después de la quimioterapia de rescate. 12 de los 16 pacientes lograron la negatividad de la ERM y esto permitió que 7 se sometieran a un trasplante alogénico en el momento de la publicación. Las respuestas fueron duraderas en algunos pacientes, 4 de los 8 pacientes no trasplantados continuaron en remisión morfológica a los 24 meses de seguimiento, aunque las curvas de supervivencia de esta cohorte aún no son estables.

Un estudio publicado recientemente en una cohorte de pacientes pediátricos y adultos jóvenes, predominantemente con LLA, proporciona el primer análisis por intención de tratar de sus resultados. Esto puede ayudar a eliminar el sesgo inherente a excluir a los pacientes que no reciben la dosis anticipada de células CAR T (Lee et al. (2014) Lancet. Doi: 10.1016/S0140-6736 (14) 61403-3). 21 pacientes fueron tratados con un CAR de segunda generación que contiene el dominio CD28. Todos menos 2 pacientes recibieron la dosis anticipada de células T, lo que destaca la posibilidad de administrar este tratamiento a aquellos con LLA refractaria o con recaídas múltiples. Este estudio muestra la siguiente eficacia: el 67% logró una remisión completa y el 60% de las personas con LLA logró un estado negativo de ERM.

Inmunotoxicidad de la terapia CAR contra CD19

El síndrome de liberación de citoquinas (SLC) abarca una gama de síntomas inflamatorios que van desde una insuficiencia leve a multiorgánica con hipotensión e insuficiencia respiratoria. Algún grado de SLC ocurre comúnmente en pacientes tratados con células T CD19 CAR. Aproximadamente el 30% (21/73) de los pacientes tratados en cohortes recientes mostraron algún grado de SLC (Davila et al. (2014) como anteriormente; Lee et al. (2014) como anteriormente; Kochenderfer (2014) J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.. doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025). También se ha observado SLC en pacientes tratados con blinatumomab, un anticuerpo recombinante de cadena única biespecífico que reconoce tanto CD19 como CD3. El SLC ocurre típicamente 5-21 días después de la infusión de células T CAR.

El SLC puede ser potencialmente mortal y requiere tratamiento en un entorno de cuidados intensivos. El SLC se asocia con niveles elevados de citoquinas en suero. Las citoquinas más elevadas significativamente son IL-6, IL-10 e interferón gamma (IFN γ). Las manifestaciones clínicas de SLC grave (fiebre, hepatosplenomegalia, coagulopatía e hiperferritinemia) se asemejan al síndrome de activación de macrófagos (MAS) encontrado, por ejemplo, en pacientes con defectos congénitos en las células T. Esto sugiere que los procesos inmunopatológicos comunes están involucrados. En la actualidad, no está claro qué tipo de célula (las células CAR T, las células tumorales moribundas o los macrófagos activados localmente) son responsables de la producción de las citoquinas clave, particularmente la IL-6. Sin embargo, un factor de iniciación clave en el MAS es la liberación de abundante interferón gamma (López-Alvarez et al. (2009). Clin. Vaccine Immunol. CVI 16, 142-145).

Neurotoxicidad

Varios pacientes en estudios de CD19 CAR en instituciones han desarrollado neurotoxicidad transitoria con un espectro de gravedad desde la afasia hasta la disgregación, el delirio y las convulsiones (Davila et al (2014) como anteriormente). Esto parece estar restringido a pacientes con LLA y se ha documentado un síndrome similar después de la terapia con blinatumomab. Las imágenes del cerebro parecen normales. La neurotoxicidad puede reflejar altos niveles de citoquinas sistémicas que cruzan la barrera hematoencefálica.

Persistencia, recaída y agotamiento de células T

Las respuestas duraderas parecían correlacionarse con niveles máximos más altos de células T transducidas con CAR en circulación, así como con la duración de la aplasia de células B. Con excepción de los pacientes que recaen con la enfermedad de CD19, la recaída se asoció generalmente con la pérdida de células CAR T circulantes y la recuperación de las células B normales.

El agotamiento de las células T es un estado de disfunción de las células T que surge durante muchas infecciones crónicas y el cáncer. Se define por una función efectora deficiente, expresión sostenida de receptores inhibitorios y un estado transcripcional distinto del de las células T efectoras o de memoria funcionales. El agotamiento evita el control óptimo de infecciones y tumores. Recientemente, ha surgido una imagen más clara del perfil funcional y fenotípico de las células T agotadas con la expresión del receptor inhibitorio de la muerte programada 1 (PD-1; también conocido como PDCD1), un regulador negativo de las células T activadas, siendo una característica clave (Day et al. (2006) Nature 443, 350-354).

Las respuestas en los estudios CD19 CAR sugieren que la persistencia de las células T durante un período prolongado en niveles altos parece ser importante para lograr respuestas duraderas. Un CD19 CAR que reduce el agotamiento de las células T puede resultar en mejores respuestas clínicas.

El documento WO2014184143 describe un CAR específico para CD19 que comprende un scFv derivado del anticuerpo monoclonal 4G7.

Por lo tanto, existe la necesidad de un CAR alternativo dirigido contra CD19 que no esté asociado con las desventajas anteriores.

Descripción de las figuras

Figura 1. Secuencias anotadas y numeradas (a) CAT19 VH (b) CAT19 VL

Las secuencias de VH y VL se numeran utilizando la numeración de Chothia. Se muestran las regiones marco y las regiones CDR. También se muestran las inserciones.

Figura 2. Tinción de células CD19 positivas con células recombinantes CAT19

SupT1 normalmente no expresa CD19, pero se diseñó para hacerlo en este estudio. Las secuencias CAT19 VH y VL se clonaron en el formato de cadena pesada de IgG2a de ratón y en el formato de cadena ligera kappa de ratón, ambos en plásmidos de expresión de mamíferos. Las células 293T se transfectaron simultáneamente con ambas cadenas pesada y ligera y el anticuerpo resultante se purificó con proteína A. Las células SupT1 y SupT1.CD19 se tiñeron con este anticuerpo recombinante (o sobrenadante de 293T simple) y se tiñeron con un anticuerpo anti-ratón conjugado con fluorescencia. La unión del anticuerpo CAT19 recombinante podría detectarse fácilmente mediante citometría de flujo.

Figura 3. Tinción de células CD19 positivas con scFv CAT19

El VH y el VL de CAT19 se clonaron de manera que forman un scFv en el que el VH y el VL se separan mediante un enlazador (SGGGGS)₃. Se generaron dos scFv con CAT scFv en ambas orientaciones VH-VL y VL-VH. Además, se generaron scFv, también en cualquier orientación, a partir de los anticuerpos anti-CD19 fmc63 y 4g7. (a) Formato de presentación de scFv: este es un vector retroviral por el cual el scFv se clona en un espaciador Fc de IgG1 humano que tiene el dominio transmembrana CD8 y los primeros 12 residuos del endodominio CD8. Esto, a su vez, está en el marco del péptido FMV-2A TaV y CD34 humano truncado. De esta manera, el scFv se muestra en la superficie de una célula, y la expresión del transgén se puede controlar detectando CD34 por separado. Se generaron células SupT1 que expresan cualquiera de los 6 formatos diferentes de scFv y estas células se tiñeron con Fc humana truncada recombinante de fusión de CD19 - IgG2a de ratón y anti-CD34; (b) Tinción con formato fmc63 VH-VL y VL-VH; (c) Tinción con formato 4g7 VH-VL y VL-VH; y (d) tinción con formato CAT19 VH-VL y VL-VH. Sorprendentemente, el scFv CAT19 VH-VL se unió bien, mientras que el scFv VL-VH dio una unión significativamente menos detectable.

Figura 4. Diferentes generaciones de CAR y CAR iniciales probadas

(a) Un formato CAR típico que comprende un dominio de unión a antígeno (que generalmente es un scFv), un dominio espaciador, un dominio transmembrana y uno o varios dominios de señalización. (b) Los CAR de primera generación transmiten una señal de activación; su endodominio se deriva del endodominio del receptor FcGamma o del endodominio CD3 Zeta; (c) Los receptores de segunda generación transmiten dos señales: sus endodominios comprenden un dominio coestimulador conectado al endodominio de CD3-Zeta. El dominio coestimulador suele ser el endodominio de CD28, el endodominio de OX40 o el endodominio de 41BB. (d) Los receptores de tercera generación transmiten tres señales: sus endodominios comprenden una fusión del endodominio CD28 con el endodominio 41BB y con el endodominio CD3-Zeta, o el endodominio CD28 con el endodominio OX40 y con el endodominio CD3-Zeta. (e) El CAR basado en CAT19 inicialmente probado que comprende un scFv en la orientación VH-VL, un espaciador de tallo de CD8 y un endodominio de segunda generación que comprende 41BB-Zeta (formato Campana CAR).

Figura 5. Comparación in vitro de la función CAT19 CAR frente a fmc36 CAR

Se transdujeron células T humanas primarias de 5 donantes diferentes con vectores lentivirales que codifican CAR CAT19 en formato Campana o el propio Campana CAR. Estas células T se usaron luego en varios ensayos. (a) El ensayo de liberación de cromo se realizó contra células SupT1. Estas células son CD19 negativas. Ninguna de las células T CAR respondieron a esta línea celular (líneas de puntos). El ensayo de liberación de cromo se realizó contra SupT1.CD9. Ambos CAR se comportaron igual contra esta línea celular (líneas continuas). A continuación, se realizó un ensayo de desgranulación utilizando células NT T, células Fmc63 CAR T o células T CAT19 CAR contra SupT1 o SupT1.CD19. se muestran (b) los datos de células T CD4+, y (c) células T CD8+. La desgranulación se incrementó con células T CAR19 CAR. (d) La proliferación se estimó utilizando la incorporación de timidilación tritiada. NT, células T fmc63 CAR, células T CAT19 CAR se probaron contra SupT1. CD19. En este experimento, también se probó un CAR irrelevante dirigido a contra GD2. Hubo una tendencia de incrementar la proliferación con células T CAR19 CAR. (e) liberación de interferón gamma a partir de las células NT T, células T Fmc63 CAR, células T CAT19 CAR o células T GD2 CAR 24 horas después de enfrentarlas contra las células SupT1 o SupT1.CD19. Las células T CAR CAT19 produjeron significativamente menos IF- γ que las células T CAR fmc63 cuando se enfrentaron con dianas CD19+.

Figura 6. Modelo in vivo de la eficacia de CAT19.

(a) Esquema de configuración experimental para el modelo in vivo. A los ratones NSG se les inyectaron 2.5×10^5 células Raji.FLuc mediante inyección en la vena de la cola. 24 horas más tarde, se administraron 4×10^6 de cualquiera de las células T primarias humanas NT, o las células T transducidas con fmc63 CAR, o las células T transducidas con CAT19 CAR se administraron a través de la vena de la cola. La respuesta del tumor se midió secuencialmente mediante imágenes de bioluminiscencia. Se tomó una muestra de sangre de la vena de la cola el día 4 para injerto y citoquina sérica. Los animales se sacrificaron el día 11 y se estudiaron los tejidos para determinar la persistencia de las células T CAR y la carga tumoral. (b) Imágenes de bioluminiscencia de las diferentes cohortes de ratones en el día 10. Se observa una enfermedad extensa en la pelvis, la columna vertebral, las costillas, el cráneo y el bazo de ratones tratados con células T NT, mientras que la señal mínima es evidente en los ratones que recibieron cualquiera de las células T CAT19 CAR, o células T fmc63 CAR. (c) Señal bioluminiscente cuantitativa promediada de diferentes cohortes de ratón a lo largo del tiempo. El eje Y es una escala logarítmica; Se observa una clara diferencia entre la acumulación de señal en ratones que recibieron células T NT y ratones que recibieron células T CAR. No se observan diferencias en la acumulación de señal en ratones que recibieron células T fmc63 CAR o células T CAT19CAR. (d) Carga de tumor determinada por citometría de flujo en médula ósea de ratones al final del experimento. Prácticamente no se pudieron detectar células Raji en la médula ósea de ratones que recibieron células T fmc63 o CAT19 CAR.

Figura 7. Caracterización de las células T CAR persistentes in vivo

(a) Números absolutos de células T CAR en los bazos de ratones de animales tratados con células T fmc63 CAR o células T CAT19 CAR en el modelo descrito anteriormente. Esto muestra que los mismos números están presentes en ambos; (b) Números absolutos de células T CAR en la médula ósea de ratones tratados con células T fmc63 CAR o células T CAT19 CAR. Esto muestra que los mismos números de células están presentes en ambos; (c) números absolutos de células T CAR que expresan PD1 en el bazo y (d) médula ósea de ratones tratados con células T fmc63 CAR o células T CAT19 CAR. Menos células T CAT19 son PD1+ en ambos compartimentos.

Resumen de los aspectos de la invención.

Los presentes inventores han desarrollado un nuevo CAR específico para CD19 con CDR que no se han descrito previamente. Tiene una potencia equivalente al CAR basado en fmc63 utilizado en los estudios UPENN, pero produce una toxicidad reducida y un agotamiento reducido de las células T.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a CD19 que comprende a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) con las siguientes secuencias:

CDR1 - GYAFSSS (Id. de Sec. n° 1);
CDR2 - YPGDED (Id. de Sec. n° 2)
CDR3 - SLLYGDYLDY (Id. de Sec. n° 3); y

b) una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene CDR con las siguientes secuencias:

CDR1 - SASSSVSYMH (Id. de Sec. n° 4);
CDR2 - DTSKLAS (Id. de Sec. n° 5)
CDR3 - QQWNINPLT (Id. de Sec. n° 6).

El dominio de unión a CD19 puede comprender un dominio VH que tiene la secuencia mostrada como Id. de Sec. n° 7 y/o un dominio VL que tiene la secuencia mostrada como Id. de Sec. n° 8 o una variante de la misma que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia.

El dominio de unión a CD19 puede comprender un scFv en la orientación VH-VL.

5 El dominio de unión a CD19 puede comprender la secuencia mostrada como Id. de Sec. nº 9 o una variante de la misma que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia.

El dominio de unión a CD19 puede comprender los 6 CDR definidos en la reivindicación 1 injertadas en un armazón de anticuerpo humano.

10 El dominio de unión a CD19 y el dominio transmembrana pueden estar conectados por un espaciador, que puede comprender uno de los siguientes: un dominio Fc de IgG1 humano; una bisagra IgG1; o un tallo de CD8. El espaciador puede comprender un tallo de CD8.

15 El CAR puede comprender o asociarse con un dominio de señalización de células T intracelular.

El dominio de señalización de células T intracelular puede comprender uno o más de los siguientes endodominios: endodominio CD28; endodominio 41BB, endodominio OX40 y endodominio CD3-Zeta.

20 En particular, el CAR puede comprender un espaciador de tallo de CD8 y un dominio de señalización de células T intracelular que comprende el endodominio 41BB y el endodominio CD3-Zeta.

En particular, el CAR puede comprender un espaciador de tallo de CD8 y un dominio de señalización de células T intracelular que comprende el endodominio OX40 y el endodominio CD3-Zeta.

25 En una realización alternativa, el dominio de señalización de células T intracelular puede comprender todos los siguientes endodominios: endodominio CD28; OX40 y CD3-Zeta.

30 El CAR puede comprender la secuencia mostrada como cualquiera de las Id. de Sec. nº 10 a 15 o una variante de las mismas que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia pero retiene la capacidad de i) unirse a CD19 y ii) inducir la señalización de las células T. El CAR puede tener propiedades ventajosas en comparación con el CAR basado en fmc63 utilizado en los estudios UPENN. Por ejemplo, el CAR, cuando se expresa por una célula T y se usa para reconocer a una célula que expresa CD19, puede causar una liberación menor de IFN γ por la célula diana que expresa CD19 que la causada por una célula T que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a CD19 que comprende: a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) con las siguientes secuencias: CDR1 - GVSLPDY (Id. de Sec. nº 16); CDR2 - WGSET (Id. de Sec. nº 17); CDR3 - HYYYGGSYAMDY (Id. de Sec. nº 18); y b) una región variable (VL) de la cadena ligera que tiene CDR con las siguientes secuencias: CDR1 - RASQDISKYLN (Id. de Sec. nº 19); CDR2 - HTSRLHS (Id. de Sec. nº 20) CDR3 - QQGNTLPYT (Id. de Sec. nº 21). Los CDR pueden ser injertados en un armazón humano o humanizado.

40 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

45 En un tercer aspecto, se proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

En un tercer aspecto, se proporciona una célula que comprende un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

50 La célula puede ser una célula inmune citolítica, tal como una célula T o una célula asesina natural (NK).

En un cuarto aspecto se proporciona una composición celular que comprende una pluralidad de células de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

55 En un quinto aspecto, se proporciona un método para fabricar una célula de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, que comprende la etapa de transducir o transfectar una célula con un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

60 En un sexto aspecto, se proporciona un método para preparar una composición celular de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención que comprende la etapa de transducir o transfectar una muestra de células de un sujeto ex vivo con un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

La muestra de células puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre o un derivado de la misma, tal como una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

65

En un séptimo aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una composición celular de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. .

- 5 En un octavo aspecto, se proporciona un método para tratar el cáncer que comprende la etapa de administrar una célula de acuerdo con el primer aspecto de la invención, una composición celular de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con el séptimo aspecto de la invención a un sujeto.

10 El método puede comprender la etapa de transducir o transfectar células del sujeto ex vivo con un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, y luego administrar las células transfectadas, o algunas de ellas, al sujeto.

También se proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con el séptimo aspecto de la invención para uso en el tratamiento del cáncer.

- 15 También se proporciona el uso de una célula de acuerdo con el tercer aspecto de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer.

El cáncer puede, por ejemplo, ser un tumor maligno de células B.

- 20 Descripción detallada

Receptores de antígenos quiméricos (CAR)

25 Los receptores de antígeno quimérico (CAR), también conocidos como receptores de células T quiméricos, receptores de células T artificiales e inmunoreceptores quiméricos, son receptores modificados por ingeniería genética, que injertan una especificidad arbitraria en una célula efectora inmune. En una CAR clásica, la especificidad de un anticuerpo monoclonal se injerta en una célula T. Los ácidos nucleicos que codifican CAR pueden transferirse a células T utilizando, por ejemplo, vectores retrovirales. De esta manera, se puede generar un gran número de células T específicas del cáncer para la transferencia de células adoptivas. Los ensayos clínicos de fase I de este enfoque muestran eficacia.

30 El dominio de unión al antígeno diana de un CAR se fusiona comúnmente a través de un espaciador y un dominio transmembrana a un endodominio. El endodominio puede comprender o asociarse con un dominio de señalización de células T intracelular. Cuando el CAR se une al antígeno objetivo, esto se traduce en la transmisión de una señal de activación a la célula T en la que se expresa.

35 El CAR de la presente invención comprende un dominio de unión a CD19 que se basa en un anticuerpo monoclonal anti-CD19 de ratón, que comprende

- 40 a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) con las siguientes secuencias:

CDR1 - GYAFSSS (Id. de Sec. nº 1);
CDR2 - YPGDED (Id. de Sec. nº 2)
45 CDR3 - SLLYGDYLDY (Id. de Sec. nº 3); y

- b) una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene CDR con las siguientes secuencias:

50 CDR1 - SASSSVSYMH (Id. de Sec. nº 4);
CDR2 - DTSKLAS (Id. de Sec. nº 5)
CDR3 - QQWNINPLT (Id. de Sec. nº 6).

55 Puede ser posible introducir una o más mutaciones (sustituciones, adiciones o eliminaciones) en cada CDR sin afectar negativamente a la actividad de unión a CD19. Cada CDR puede, por ejemplo, tener una, dos o tres mutaciones de aminoácidos.

60 Las CDR pueden estar en el formato de un fragmento variable de una sola cadena (scFv), que es una proteína de fusión de la región variable pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) de un anticuerpo, conectado con un péptido enlazador corto de entre 10 a aproximadamente 25 aminoácidos. El scFv puede estar en la orientación VH-VL, es decir, el VH está en el extremo amino de la molécula CAR y el dominio VL está vinculado al espaciador y, a su vez, al dominio transmembrana y el endodominio.

65 Las CDR pueden estar injertadas en el armazón de un anticuerpo humano o scFv. Por ejemplo, el CAR de la presente invención puede comprender un dominio de unión a CD19 que consiste o comprende una de las siguientes secuencias.

El CAR de la presente invención puede comprender la siguiente secuencia de VH: Id. de Sec. nº 7 - secuencia de VH de anticuerpo monoclonal murino

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDEDTNYSKG
FKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSS

El CAR de la presente invención puede comprender la siguiente secuencia de VL: Id. de Sec. nº 8 - secuencia de VL de anticuerpo monoclonal murino

QIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSGVPDRFSG
SGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKR

El CAR de la invención puede comprender la siguiente secuencia de scFv: Id. de Sec. nº 9 - secuencia de scFv de VH-VL de anticuerpo monoclonal murino

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDEDTNYSKG
FKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGG
GGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSG
VGPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKR

El CAR puede consistir en o comprender una de las siguientes secuencias:

Id. de Sec. nº 10 - CAR CAT19 usando la arquitectura "Campana" (ver Ejemplos)

MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRP
KLEWIGRIYPGDEDTNYSKGFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDY
LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMH
YQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSGVPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTF
GAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRV
KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Id. de Sec. nº 11 - CAR CAT19 con un endodominio OX40-Zeta

MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRP
KLEWIGRIYPGDEDTNYSKGFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDY
LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMH
YQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSGVPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTF
GAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLSLVITLYCRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Id. de Sec. nº 12 - CAT19 CAR con un endodominio CD28-Zeta.

MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRP
KLEWIGRIYPGDEDTNYSKGFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDY
LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMH
YQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSGVPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTF
GAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVK
FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Id. de Sec. nº 13 - CD19 CAR de tercera generación.

MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRP
KGLEWIGRIYPGDEDTNYSKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDY
LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMHW
YQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVDPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTF
GAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVL
VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR
SRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Id. de Sec. nº 14 - CD19 CAR con espaciador de bisagra IgG1.

MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRP
KGLEWIGRIYPGDEDTNYSKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDY
LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMHW
YQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVDPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTF
GAGTKLELKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCPKDPKFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK
RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDL
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Id. de Sec. nº 15 - CD19 CAR con bisagra-CH2-CH3 de IgG1 humana. Con los sitios de unión de FcR mutados

MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRP
KGLEWIGRIYPGDEDTNYSKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDY
LDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMHW
YQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVDPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTF
GAGTKLELKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWV
LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY
RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDLQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

El CAR de la invención puede comprender una variante de la secuencia mostrada como Id. de Sec. nº 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 que tiene al menos 80, 85, 90, 95, 98 o 99% de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante retenga la capacidad de unirse a CD19 (cuando esté junto con un dominio VL o VH complementario, si corresponde).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de polipéptidos se puede determinar fácilmente mediante programas como BLAST que está disponible gratuitamente en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

Dominio transmembrana

El CAR de la invención también puede comprender un dominio transmembrana que se extiende por la membrana. Puede comprender una hélice alfa hidrófoba. El dominio transmembrana puede derivarse de CD28, que proporciona una buena estabilidad del receptor.

El dominio de transmembrana puede comprender la secuencia mostrada como Id. de Sec. nº 22.

Id. de Sec. nº 22

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

Dominio de señalización de células intracelulares (endodominio)

El endodominio es la porción de transmisión de señal del CAR. Después del reconocimiento de antígenos, los receptores se agrupan y se transmite una señal a la célula. El componente de endodominio más utilizado es el de CD3-zeta que contiene 3 ITAM. Esto transmite una señal de activación a la célula T después de que el antígeno se une. Es posible que CD3-zeta no proporcione una señal de activación totalmente competente y que se necesite una señalización coestimuladora adicional. Por ejemplo, los endodominios de CD28, OX40 o 41BB se pueden usar con CD3-Zeta para transmitir una señal de proliferación/supervivencia, o los tres se pueden usar juntos.

Los primeros diseños de CAR tenían endodominios derivados de las partes intracelulares de la cadena γ de Fc ϵ R1 o CD3 ζ . En consecuencia, estos receptores de primera generación transmitieron la señal inmunológica 1, que fue suficiente para desencadenar la muerte de las células T de las células dianas afines, pero no logró activar completamente la célula T para proliferar y sobrevivir. Para superar esta limitación, se construyeron endodominios compuestos. La fusión de la parte intracelular de una molécula coestimuladora de células T con el CD3 ζ dio lugar a receptores de segunda generación que podían transmitir una señal de activación y coestimulación simultáneamente después del reconocimiento del antígeno. El dominio coestimulador más utilizado fue el de CD28. Esto proporciona la señal coestimuladora más potente, a saber, la señal inmunológica 2, que desencadena la proliferación de células T. También se describieron algunos receptores que incluían endodominios de la familia de receptores de TNF, como OX40 y 41BB, que transmiten señales de supervivencia. Finalmente, se describieron CAR aún más potentes de tercera generación que tenían endodominios capaces de transmitir señales de activación, proliferación y supervivencia. Los CAR y sus diferentes generaciones se resumen en la Figura 4.

El endodominio del CAR de la presente invención puede comprender combinaciones de uno o más del endodominio CD3-Zeta, el endodominio 41BB, el endodominio OX40 o el endodominio CD28.

El dominio de señalización intracelular de células T (endodominio) del CAR de la presente invención puede comprender la secuencia mostrada como Id. de Sec. n° 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o una variante de la misma que tenga al menos 80% de identidad de secuencia.

Id. de Sec. n° 23 (endodominio CD3 zeta)

RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Id. de Sec. n° 24 (endodominio 41BB)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

Id. de Sec. n° 25 (endodominio OX40)

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

Id. de Sec. n° 26 (endodominio CD28)

KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY

Los ejemplos de combinaciones de tales endodominios incluyen 41BB-Z, OX40-Z, CD28-Z y CD28-OX40-Zeta.

Id. de Sec. n° 27 (fusión de endodominio 41BB-Z)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Id. de Sec. n° 28 (fusión de endodominio OX40-Z)

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Id. de Sec. n° 29 (fusión de endodominio CD28Z)

KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Id. de Sec. nº 30 (CD28OXZ)

KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTP IQE
EQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5 Una secuencia de variante puede tener al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia con el Id. de Sec. nº 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 siempre que la secuencia proporcione un dominio transmembrana efectivo/dominio de señalización de células T intracelular.

10 Péptido señal

El CAR de la presente invención puede comprender un péptido señal de manera que cuando el CAR se expresa dentro de una célula, como las células T, la proteína nascente se dirige al retículo endoplásmico y, posteriormente, a la superficie celular, donde se expresa.

15 El núcleo del péptido señal puede contener un largo tramo de aminoácidos hidrófobos que tiene una tendencia a formar una única hélice alfa. El péptido señal puede comenzar con un tramo corto de aminoácidos cargados positivamente, lo que ayuda a imponer una topología adecuada del polipéptido durante la translocación. Al final del péptido señal hay típicamente un tramo de aminoácidos que se reconoce y se escinde mediante la peptidasa señal.
20 La peptidasa señal puede escindirse durante o después de la finalización de la translocación para generar un péptido señal libre y una proteína madura. Los péptidos de señal libre son luego digeridos por proteasas específicas.

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

25 El CAR de la invención puede tener la fórmula general: péptido de señal - dominio de unión a CD19 - dominio espaciador - dominio de transmembrana/dominio de señalización de células T intracelular.

El péptido señal puede comprender el Id. de Sec. nº 31 o una variante del mismo que tenga 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones de aminoácidos (inserciones, sustituciones o adiciones) siempre que el péptido señal aún funcione para causar la expresión de la superficie celular del CAR.

30 Id. de Sec. nº 31: METDTLLLVLVLLVVPSTG

El péptido señal del Id. de Sec. nº 31 es compacto y altamente eficiente. Se predice que proporcionará una escisión del 95% después de la glicina terminal, lo que proporcionará una eliminación eficiente mediante la peptidasa señal.

35 Espaciador

El CAR de la presente invención puede comprender una secuencia espaciadora para conectar el dominio de unión a CD19 con el dominio transmembrana y separar espacialmente el dominio de unión a CD19 del endodominio. Un espaciador flexible permite que el dominio de unión a CD19 se oriente en diferentes direcciones para habilitar la unión a CD19.

La secuencia espaciadora puede, por ejemplo, comprender una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8, o una combinación de los mismos. El espaciador puede comprender alternativamente una secuencia alternativa que tiene una longitud y/o propiedades de espaciado de dominio similares a las de una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8.

Se puede alterar un espaciador de IgG1 humano para eliminar los motivos de unión a Fc.

50 Los ejemplos de secuencias de aminoácidos para estos espaciadores se proporcionan a continuación:

Id. de Sec. nº 32 (bisagra-CH2CH3 de IgG1 humana)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK
55 SLSLSPGKKD

Id. de Sec. nº 33 (tallo de CD8 humano):

TTTPAPRPPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

Id. de Sec. nº 34 (IgG1 humano) :

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

Id. de Sec. nº 35 (IgG1 bisagra-Fc)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKKDPK

Id. de Sec. nº 36 (Bisagra IgG1 - Fc modificada para eliminar los motivos de reconocimiento del receptor Fc)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVA*GPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKKDPK

Los residuos modificados están subrayados; * denota una eliminación.

Liberación de interferón y agotamiento de células T CAR

Los presentes inventores han encontrado que un CD19 CAR basado en el scFv CAT19 tiene propiedades que pueden dar como resultado una menor toxicidad y una mejor eficacia.

Dado que la experiencia principal con la terapia CD19 CAR ha sido con CAR basados en fmc63 scFv, y que el conjunto de datos clínicos más antiguo, más grande y quizás más significativo es con Campana CAR basado en fmc63, los presentes inventores tomaron el Campana CAR como el "patrón oro". Por lo tanto, se realizó una comparación entre el CAR fmc63-Campana y un CAR similar pero con CAT19 scFv en lugar de fmc63. Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que mientras que las células T CAT19 CAR efectuaban la destrucción de las células diana que expresaban CD19, y proliferaban en respuesta a las dianas que expresaban CD19, la liberación de interferón gamma era menor. Además, un pequeño modelo animal de un linfoma de células B agresivo mostró la misma eficacia y el mismo injerto entre los CAR basados en fmc63 y CAT19, pero, sorprendentemente, se agotaron menos células T CAT19 CAR que las células T fmc63 CAR.

El CAR de la invención puede causar un 25, 50, 70 o 90% menos de liberación de IFN γ en un ensayo comparativo que implica poner células T CAR en contacto con células diana.

El CAR de la invención puede dar como resultado que una proporción menor de células T CAR se agoten en comparación con las células T fmc63 CAR. El agotamiento de las células T se puede evaluar utilizando métodos conocidos en la técnica, como el análisis de la expresión de PD-1. El CAR de la presente invención puede causar un 20, 30, 40, 50, 60% menos de células T CAR expresen PD-1 que células T fmc63 CAR en un ensayo comparativo que implica poner células T CAR en contacto con células diana.

Secuencia de ácido nucleico

El segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR del primer aspecto de la invención.

La secuencia de ácido nucleico puede ser capaz de codificar un CAR que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como cualquiera de los Id. de Sec. nº: 10-15.

Vector

La presente invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Un vector de este tipo puede usarse para introducir la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped de manera que exprese y produzca una molécula de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral.

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

Célula

La invención también proporciona una célula que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención. La invención proporciona una célula que expresa un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención en la superficie celular.

La célula puede ser una célula inmune citolítica, tal como una célula T o una célula asesina natural (NK).

Una célula capaz de expresar un CAR de acuerdo con la invención puede fabricarse mediante transducción o transfectación de una célula con ácido nucleico que codifica CAR.

La célula que expresa CAR de la invención puede generarse ex vivo. La célula puede ser de una muestra de células, como una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del paciente o un donante. Las células pueden activarse y/o expandirse antes de ser transducidas con ácido nucleico que codifica CAR, por ejemplo mediante tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD3.

Composición farmacéutica

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene una célula que expresa CAR, o una pluralidad de células de la invención junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más polipéptidos farmacéuticamente activos y/o compuestos. Dicha formulación puede estar, por ejemplo, en una forma adecuada para infusión intravenosa.

Método de tratamiento

Las células que expresan CAR de la presente invención pueden ser capaces de destruir células cancerosas, tales como células de linfoma de células B. Las células que expresan CAR, como las células T o las células NK, pueden crearse ex vivo a partir de la propia sangre periférica del paciente (primera fuente) o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica de donante (segunda fuente), o sangre periférica de un donante no conectado (tercera fuente). Alternativamente, las células que expresan CAR pueden derivarse de la diferenciación ex vivo de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias a células tales como células T. En estos casos, las células CAR se generan mediante la introducción de DNA o RNA codificante de CAR por uno de los muchos medios que incluyen la transducción con un vector viral, la transfección con DNA o RNA.

Las células T o NK que expresan una molécula CAR de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de una enfermedad cancerosa, en particular una enfermedad cancerosa asociada con la expresión de CD19.

Un método para el tratamiento de la enfermedad se refiere al uso terapéutico de una célula o población de células de la invención. A este respecto, las células pueden administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o afección existente para disminuir, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o para disminuir, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad. El método de la invención puede causar o promover la muerte mediada por células de células que expresan CD19, tales como las células B.

La invención se describirá ahora adicionalmente a modo de ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no están destinados de ninguna manera a limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 Clonación de VH y VL y demostración de la unión a CD19

El VH y el VL se clonaron a partir de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 de ratón y se fusionaron en el marco con la región constante kappa humana y la región constante IgG1 humana. Estas cadenas pesadas y ligeras quiméricas se clonaron en un vector de expresión y se usaron para transfectar células 293T. El anticuerpo producido posteriormente se usó para teñir las células SupT1 (una línea de células T que es negativa para CD19), y las células SupT1 que se han diseñado para que sean positivas para CD19. Esta tinción muestra la unión específica del CD19 (Figura 2).

Ejemplo 2: Demostración de que el VH/VL puede formar un scFv que se une a CD19

Luego se investigó si el VH y VL clonados podían unirse a CD19 en un formato scFv. El VH y el VL se clonaron como un scFv en dos orientaciones: VH-VL y VL-VH, donde las dos regiones variables se separaron mediante un enlazador que comprende (SGGGG)₄. Estos scFv se clonaron en un CAR sin señalización coexpresado con CD34 truncado como se muestra en la Figura 3a. Brevemente, esto comprende un péptido señal, scFv, bisagra-CH2-CH3 de IgG1 humana, el dominio transmembrana de CD8, los primeros 12 residuos del endodominio CD8, un péptido TeV de FMD-2A, CD34 humano truncado. Para permitir la comparación, se clonaron scFv de fmc63 y scFv de otro anti-CD19 hibridoma 4g7 en el mismo formato en ambas orientaciones VH-VL y VL-VH.

De esta manera, se pueden estudiar varios parámetros: (1) la unión del antígeno diana al CAR mediante el uso de antígeno diana cognado recombinante fusionado con Fc murino, suelto para la internalización del receptor debido a la señalización; (2) La estabilidad del receptor puede determinarse utilizando anti-Fc policlonal; (3) los niveles de expresión del casete se pueden controlar mediante tinción conjunta para CD34.

Estas construcciones se transdujeron en células SupT1. Se generó una fusión de IgG2aFc recombinante de CD19 de ratón. Las células SupT1 se tiñeron para Fc de ratón, Fc humana y anti-CD34 con anticuerpos conjugados a diferentes fluoróforos y la estabilidad/unión se analizó mediante citometría de flujo.

Las secuencias de los diferentes scFv utilizados se detallan a continuación:

> scFv_fmc63_VH-VL (Id. de Sec. nº 37)

```
EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSAL
KSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSG
GGGGSGGGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL
HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITKA
```

> scFv_fmc63_VL-VH (Id. de Sec. nº 38)

```
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS
GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSEV
KLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSALKS
RLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS
```

> scFv_4g7_VH-VL (Id. de Sec. nº 39)

```
EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEK
FKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSSGGGGG
GGGGSGGGGSDIVMTQAAPSIPTVPGESVSI SCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLI
YRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDGVVYCMQHLEYPFTFGAGTKLELKR
```

> scFv_4g7_VL-VH (Id. de Sec. nº 40)

```
DIVMTQAAPSIPTVPGESVSI SCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLASGV
PDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDGVVYCMQHLEYPFTFGAGTKLELKRSGGGGSGGGGSGG
GGSEVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTY
NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSS
```

➤ scFv_CAT_VH-VL (Id. de Sec. nº 9)

```
QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDEDTNYSKG
FKDKATLTADKSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGG
GGSGGGGSGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAS
GVPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKR
```

➤ scFv_CAT_VL-VH (Id. de Sec. nº 41)

➤

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSGVPDRFSG
SGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSGGGGSGGGGSGGGGSQVQ
LQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDEDTNYSKFKD
KATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQTTTLTVSS

La construcción usada y los resultados de la tinción se resumen en la Figura 3. Sorprendentemente, el CAT CAR con scFv en la orientación VH-VL se une a CD19, mientras que el CAT19 CAR con scFv en la orientación VL-VH dio una unión mínima a CD19. Esto contrasta con los fmc63 CAR y 4g7 CAR que se unieron a CD19 en ambas orientaciones VL y VH. La unión y la estabilidad del VL CAT CAR parecían ser iguales a las de fmc63.

Ejemplo 3 - Comparación in vitro de la función CAT19 CAR contra fmc36 CAR

El CAT scFv en orientación VL se clonó en un armazón CAR diseñado por Campana (Imai et al (2004) Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund. UK 18: 676-684). Efectivamente, el fmc63 scFv se reemplazó con un CAT scFv, y se comparó con el CAR original basado en fmc63. Este CAR comprende un péptido señal, el scFv, un espaciador de tallo de CD8 y los endodominios transmembrana de 41BB y Zeta. Las secuencias de aminoácidos de CAT CAR y fmc63 CAR se proporcionan a continuación:

> CAT19_CAR (Id. de Sec. nº 10)

MGTSLLCWMALCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWM
NWKQRPKGLEWIGRIYPGDEDTNYSKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSED
SAVYFCARSLLYGDYLDYWGQTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIM
SASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSGVPDRFSGSGS
GTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

➤ Fmc63_CAR, según lo descrito por Imai et al (2004) como anteriormente (Id. de Sec. nº 42)

METDTLLLWVLLLWPGSTGDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL
PYTFGGGTGLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLS
VTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKS
QVFLKMNSLQTDDEAIYYCAKHYHYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSDPTTTPAPRPP
TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Las células T humanas primarias de 5 donantes diferentes se transdujeron con vectores lentivirales que codifican CAT19 CAR en formato Campana, o el propia Campana CAR fmc63. Estas células T se usaron luego en varios ensayos. El ensayo de liberación de cromo se realizó contra células SupT1. Estas células son CD19 negativas. Ninguna de las células T CAR respondió a esta línea celular, lo que demuestra que CAR19 CAR no tiene actividad destructiva inespecífica contra las células CD19 negativas. [Figura 5 (a)]. (b) El ensayo de liberación de cromo también se realizó contra células SupT1 diseñadas para expresar CD19. Ambos CAR se desempeñaron de manera igual contra esta línea celular en este ensayo con altos niveles de destrucción [Figura 5 (b)]. A continuación, se realizó un ensayo de desgranulación mediante tinción para CD107 en la superficie de las células efectoras después del co-cultivo con células diana. En este caso, se utilizaron células T NT, células T CAR fmc63 o células T CAT19 CAR como efectores y se usaron células SupT1 o SupT1.CD19 como dianas. El CD107 de superficie se detectó

mediante citometría de flujo que permitió la medición diferencial de la desgranulación de las células CD4+ y CD8+. [Figura 5 (c) y (d) respectivamente]. La desgranulación se incrementó con las células T CAT19 CAR en comparación con las células T fmc63 CAR. La proliferación se estimó utilizando la incorporación de timidilato tritiado. Aquí, las células NT, células T Fmc63 CAR, células T CAT19 CAR se cultivaron conjuntamente con células SupT1 diseñadas para expresar CD19. También se analizó la incorporación de la timidina en este experimento, de un CAR irrelevante dirigido a GD2. Hubo una tendencia a una mayor proliferación con células T CAT19 CAR. [Figura 4 (e)]. A continuación, se midió mediante ELISA la liberación de interferón-gamma de células T NT, células T fmc63 CAR, células T CAT19 CAR o células T GD2 CAR 24 horas después de enfrentarlas contra células SupT1 o SupT1.CD19. Las células T CAR CAT19 produjeron significativamente menos interferón-gamma que las células T fmc63 CAR cuando se desafiaron con dianas CD19+.

Ejemplo 4 - Demostración de la eficacia in vivo de la terapia CAT19 CAR

Un esquema de configuración experimental para este modelo in vivo está presente en la figura 6 (a). Brevemente, los ratones NSG (NOD scid gamma, NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) están lo suficientemente inmunodeprimidos que son permisivos para el injerto de líneas celulares humanas y células T primarias humanas. Las células Raji son una línea de células B derivada del linfoma de Burkitt. Estas células se injertan fácilmente dentro de la médula ósea de ratones NSG causando un síndrome agresivo similar al de la leucemia. Las células Raji fueron diseñadas para expresar la luciferasa de luciérnaga para permitir el seguimiento no invasivo utilizando imágenes de bioluminiscencia (BLI). A los ratones se les inyectaron 2.5×10^5 células Raji.FLuc mediante inyección en la vena de la cola. 24 horas más tarde, se administraron 4×10^6 de cualquiera de las células T primarias humanas NT, o las células T transducidas con fmc63CAR, o las células T transducidas con CAT19 CAR se administraron a través de la vena de la cola. La respuesta del tumor se midió secuencialmente mediante BLI. Se tomó una muestra de sangre de la vena de la cola el día 4 para el injerto y la citoquina sérica. Los animales se sacrificaron el día 11 y se estudiaron los tejidos para determinar la persistencia de las células T CAR y la carga tumoral. Las imágenes BLI de las diferentes cohortes de ratón en el día 10 se muestran en la figura 6 (b). Se observa una enfermedad extensa en la pelvis, la columna vertebral, las costillas, el cráneo y el bazo de ratones tratados con células T NT, mientras que la señal mínima es evidente en ratones que recibieron células T CAT19 CAR o células T fmc63 CAR. La señal bioluminiscente cuantitativa promediada de diferentes cohortes de ratón a lo largo del tiempo se muestra en una escala logarítmica en la figura 6 (c). Se observa una clara diferencia entre la acumulación de señales en los ratones que recibieron células T NT y en los ratones que recibieron células T CAR. No se observan diferencias en la acumulación de señales en ratones que recibieron células T fmc63 CAR o células CAT19 CAR. Finalmente, después del sacrificio, se realizó un análisis de citometría de flujo de la médula ósea de cada ratón para determinar directamente la carga tumoral. Las células Raji son fácilmente distinguibles de las células hematopoyéticas de ratón y de las células T transferidas de forma adoptiva, ya que expresan marcadores de células B humanas. Se pudieron detectar células Raji mínimas en la médula ósea de ratones que recibieron células T fmc63 o CAT19 CAR.

Ejemplo 5 - Caracterización de células T CAR persistentes in vivo

A partir de los modelos animales anteriores, los presentes inventores intentaron determinar si ambos tipos de células T CAR se injertaron dentro de la médula ósea y el bazo de estos ratones NSG. El análisis de citometría de flujo de médula ósea y bazo con cuentas de recuento permitió la determinación de números absolutos de células T CAR. Estos datos se muestran en las figuras 7 (a) y (b). Los números absolutos de células T CAR en bazos de ratones de animales tratados con células T fmc63 CAR o células T CAT19 CAR fueron similares. A continuación, los presentes inventores procedieron a determinar si había alguna diferencia en el número de células T agotadas en estos tejidos diferentes. Mediante co-tinción se pudo determinar el número de células T anteriores agotadas que expresan PD1 en las muestras. Estos datos se muestran en las figuras 7 (c) y (d). Sorprendentemente, menos células T agotadas estaban presentes en ambos compartimentos de tejido con el CAT19 CAR que con el fmc63 CAR.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCL Business PLC
 <120> Receptor de antígeno quimérico
 5 <130> P105665PCT
 <150> GB 1503742.7
 <151> 2015-03-05
 <160> 43
 <170> PatentIn versión 3.5
 10 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) de la región variable de la cadena pesada (VH) CDR1
 <400> 1

Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 1 5

20 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> VH CDR, CDR2
 <400> 2

Tyr Pro Gly Asp Glu Asp
 1 5

30 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> VH CDR, CDR3
 <400> 3

Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr
 1 5 10

40 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> región variable de cadena ligera (VL) CDR, CDR1
 <400> 4

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

50 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> VL CDR, CDR2
 <400> 5

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

60 <210> 6

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> VL CDR, CDR3
 <400> 6

Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr
 1 5

10 <210> 7
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia VH del anticuerpo monoclonal murino
 <400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

20
 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia VL del anticuerpo monoclonal murino
 <400> 8

ES 2 732 067 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 9
<211> 241
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia scFv VH-VL del anticuerpo monoclonal murino
10 <400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

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

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Phe Leu Thr Ile
195 200 205

Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
210 215 220

Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

Arg

<210> 10

<211> 488

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> receptor de antígeno quimérico CAT19 (CAR) usando la arquitectura "Campana"

<400> 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 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn
65 70 75 80

Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95

ES 2 732 067 T3

Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr
145 150 155 160

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
165 170 175

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln
180 185 190

Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu
195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
210 215 220

Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
245 250 255

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
260 265 270

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
275 280 285

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
290 295 300

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
325 330 335

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
340 345 350

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
355 360 365

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
370 375 380

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
385 390 395 400

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
405 410 415

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
420 425 430

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
435 440 445

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
450 455 460

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
465 470 475 480

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 11

5 <211> 483

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CAT19 CAR con un endodominio OX40-Zeta

10 <400> 11

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 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys
50 55 60

ES 2 732 067 T3

Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Glu	Asp	Thr	Asn	65	70	75	80
Tyr	Ser	Gly	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	85	90	95	
Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	100	105	110	
Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Leu	Asp	115	120	125	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	130	135	140	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	145	150	155	160
Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	165	170	175	
Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	180	185	190	
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	195	200	205	
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	210	215	220	
Tyr	Phe	Leu	Thr	Ile	Asn	Asn	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	225	230	235	240
Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Asn	Ile	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	245	250	255	
Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	260	265	270	
Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	275	280	285	
Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	290	295	300	

ES 2 732 067 T3

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Arg
325 330 335

Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser
340 345 350

Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu
355 360 365

Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
370 375 380

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
385 390 395 400

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
405 410 415

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
420 425 430

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
435 440 445

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
450 455 460

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
465 470 475 480

Pro Pro Arg

- 5 <210> 12
- <211> 487
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> CAT19 CAR con un endodominio CD28-Zeta
- <400> 12

ES 2 732 067 T3

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

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

<210> 13

<211> 527

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Tercera generación de CD19 CAR

<400> 13

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 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn
65 70 75 80

Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95

Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110

10

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr
145 150 155 160

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
165 170 175

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln
180 185 190

Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu
195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
210 215 220

ES 2 732 067 T3

Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
245 250 255

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
260 265 270

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
275 280 285

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
290 295 300

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
305 310 315 320

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
325 330 335

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
340 345 350

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
355 360 365

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu
370 375 380

Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro
385 390 395 400

Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg
405 410 415

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
420 425 430

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
435 440 445

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
450 455 460

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
465 470 475 480

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
485 490 495

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
500 505 510

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
515 520 525

<210> 14

<211> 465

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD19 CAR con espaciador de bisagra IgG1

<400> 14

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 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn
65 70 75 80

Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95

Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr
145 150 155 160

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
 165 170 175

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190

Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu
 195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 210 215 220

Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 245 250 255

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp
 260 265 270

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val
 275 280 285

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
 290 295 300

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
 305 310 315 320

His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
 325 330 335

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
 340 345 350

Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 355 360 365

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 370 375 380

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 385 390 395 400

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
405 410 415

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
420 425 430

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
435 440 445

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
450 455 460

Arg
465

<210> 15

<211> 681

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD19 CAR con bisagra-CH2-CH3 de IgG1 humana, sitios de unión de FcR mutados

<400> 15

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 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn
65 70 75 80

Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95

Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr
 145 150 155 160
 Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
 165 170 175
 Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190
 Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu
 195 200 205
 Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 210 215 220
 Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 245 250 255
 Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp
 260 265 270
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 275 280 285
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala
 290 295 300
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 305 310 315 320
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 325 330 335
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 340 345 350
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 355 360 365
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 370 375 380
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 405 410 415
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 420 425 430
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 435 440 445
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 450 455 460
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 465 470 475 480
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 485 490 495
 Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
 500 505 510
 Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 515 520 525
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 530 535 540
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 545 550 555 560
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 565 570 575
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 580 585 590
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 595 600 605
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 610 615 620
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 625 630 635 640

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
645 650 655

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
660 665 670

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675 680

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> VH CDR, CDR1
<400> 16

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> VH CDR, CDR2
<400> 17

Trp Gly Ser Glu Thr
1 5

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> VH CDR, CDR3
<400> 18

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> VL CDR, CDR1
<400> 19

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> VL CDR, CDR2
<400> 20

His Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> VL CDR, CDR3
<400> 21

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 22
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Secuencia
<220>
<223> dominio transmembrana
<400> 22

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 23
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> endodominio CD3 zeta
<400> 23

Arg Ser 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

Pro Arg

<210> 24
<211> 42
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> 41BB endodominio
<400> 24

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

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

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

<210> 25
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> OX40 endodomain
<400> 25

Arg 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> 26
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> endodominio CD28
<400> 26

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

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

Asp Phe Ala Ala Tyr
35

<210> 27

<211> 154

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 41BB-Z endodomain fusion

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
115 120 125

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
145 150

<210> 28
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Fusión de endodominio OX40-Z
 <400> 28

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

<210> 29
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fusión de endodominio CD28Z
 <400> 29

15
 20

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

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

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

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

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

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

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

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
115 120 125

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

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
145 150

<210> 30
<211> 187
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CD28OXZ
<400> 30

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

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

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

ES 2 732 067 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 31
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> péptido señal
<400> 31

10

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

15

<210> 32
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> espaciador (bisagra-CH2CH3 de IgG1 humana)
<400> 32

20

ES 2 732 067 T3

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

<210> 33
 <211> 46
 <212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> espaciador (CD8s humanos charla)
 <400> 33

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
 35 40 45

<210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> espaciador (bisagra IgG1 humana)
 <400> 34

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

Lys Asp Pro Lys
 20

<210> 35
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> espaciador (IgG1 Hinge-Fc)
 <400> 35

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
115 120 125

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys
225 230 235

<210> 36

<211> 236

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> espaciador (bisagra-Fc de IgG1 modificado para eliminar los motivos de reconocimiento del receptor Fc)

<400> 36

ES 2 732 067 T3

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

<210> 37
 <211> 244

ES 2 732 067 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fragmento de una sola cadena variable (scFv), scFv_fmc63_VH-VL

5 <400> 37

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser
130 135 140

Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala
145 150 155 160

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp
165 170 175

Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
180 185 190

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu
195 200 205

Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
210 215 220

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
225 230 235 240

Ile Thr Lys Ala

<210> 38

<211> 244

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> scFv, scFv_fmc63_VL-VH

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys Ala Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu
115 120 125

Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val
130 135 140

Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp
145 150 155 160

Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp
165 170 175

Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr
180 185 190

ES 2 732 067 T3

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

Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr
210 215 220

Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Ser

<210> 39

<211> 249

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> scFv, scFv_4g7_VH-VL

<400> 39

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala
130 135 140

Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg

145 150 155 160

Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp
165 170 175

Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
180 185 190

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200 205

Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
210 215 220

Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
225 230 235 240

Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
245

- 5 <210> 40
<211> 250
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
10 <223> scFv, scFv_4g7_VL-VH
<400> 40

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

ES 2 732 067 T3

Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly
130 135 140

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
145 150 155 160

Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys
180 185 190

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
195 200 205

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
245 250

- 5 <210> 41
- <211> 242
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> scFv, scFv_CAT_VL-VH
- <400> 41

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

ES 2 732 067 T3

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr
85 90 95

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln
115 120 125

Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser
130 135 140

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val
145 150 155 160

Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro
165 170 175

Gly Asp Glu Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr
180 185 190

Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser
195 200 205

Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Leu
210 215 220

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

Ser Ser

<210> 42

<211> 494

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220 >

<223> Fmc63_CAR

<400> 42

ES 2 732 067 T3

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

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

<211> 18
 <212> PR T
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 43

5

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a CD19 que comprende

5 a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) con las siguientes secuencias:

CDR1 - GYAFSSS (Id. de Sec. nº 1);
 CDR2 - YPGDED (Id. de Sec. nº 2)
 10 CDR3 - SLLYGDYLDY (Id. de Sec. nº 3); y

b) una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene CDR con las siguientes secuencias:

15 CDR1 - SASSSVSYMH (Id. de Sec. nº 4);
 CDR2 - DTSKLAS (Id. de Sec. nº 5)
 CDR3 - QQWNINPLT (Id. de Sec. nº 6).

2. Un CAR de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio de unión a CD19 comprende un dominio VH que tiene la secuencia mostrada como Id. de Sec. nº 7 y/o un dominio VL que tiene la secuencia mostrada como Id. de Sec. nº 8 o una variante de la misma que tiene al menos 95% de identidad de secuencia.

3. Un CAR de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio de unión a CD19 comprende un scFv en la orientación VH-VL; preferiblemente en el que el dominio de unión a CD19 comprende la secuencia mostrada como Id. de Sec. nº 9 o una variante de la misma que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia.

4. Un CAR de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que el dominio de unión a CD19 y el dominio transmembrana están conectados por un espaciador; opcionalmente, en el que el espaciador comprende uno de los siguientes: un dominio Fc de IgG1 humano; una bisagra IgG1; o un tallo de CD8.

5. Un CAR de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que también comprende un dominio de señalización de células T intracelular; opcionalmente, en el que el dominio de señalización de células T intracelular comprende uno o más de los siguientes endodominios: endodominio CD28; endodominio 41BB, endodominio OX40 y endodominio CD3-Zeta; preferiblemente en el que el dominio de señalización de células T intracelular comprende:

35 (i) el endodominio 41BB y el endodominio CD3-Zeta;
 (ii) el endodominio OX40 y el endodominio CD3-Zeta; o
 (iii) todos los siguientes endodominios: endodominio CD28; OX40 y CD3-Zeta.

6. Un CAR de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende la secuencia mostrada como cualquiera de las Id. de Sec. nº 10 a 15 o una variante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia pero retiene la capacidad de i) unirse a CD19 y ii) inducir la señalización de células T.

7. Un CAR de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que, cuando se expresa por una célula T y se usa para localizar una célula que expresa CD19, causa una liberación menor de IFN γ por la célula diana que expresa CD19 que la causada por una célula T que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a CD19 que comprende

a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) con las siguientes secuencias:

50 CDR1 - GVSLPDY (Id. de Sec. nº 16);
 CDR2 - WGSET (Id. de Sec. nº 17);
 CDR3 - HYYYGGSYAMDY (Id. de Sec. nº 18); y

55 b) una región variable (VL) de la cadena ligera que tiene una CDR con las siguientes secuencias:

60 CDR1 - RASQDISKYLN (Id. de Sec. nº 19);
 CDR2 - HTSRLHS (Id. de Sec. nº 20)
 CDR3 - QQGNTLPYT (Id. de Sec. nº 21).

8. Un CAR de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que las CDR están injertadas en un armazón humano o humanizado.

9. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.

10. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9.

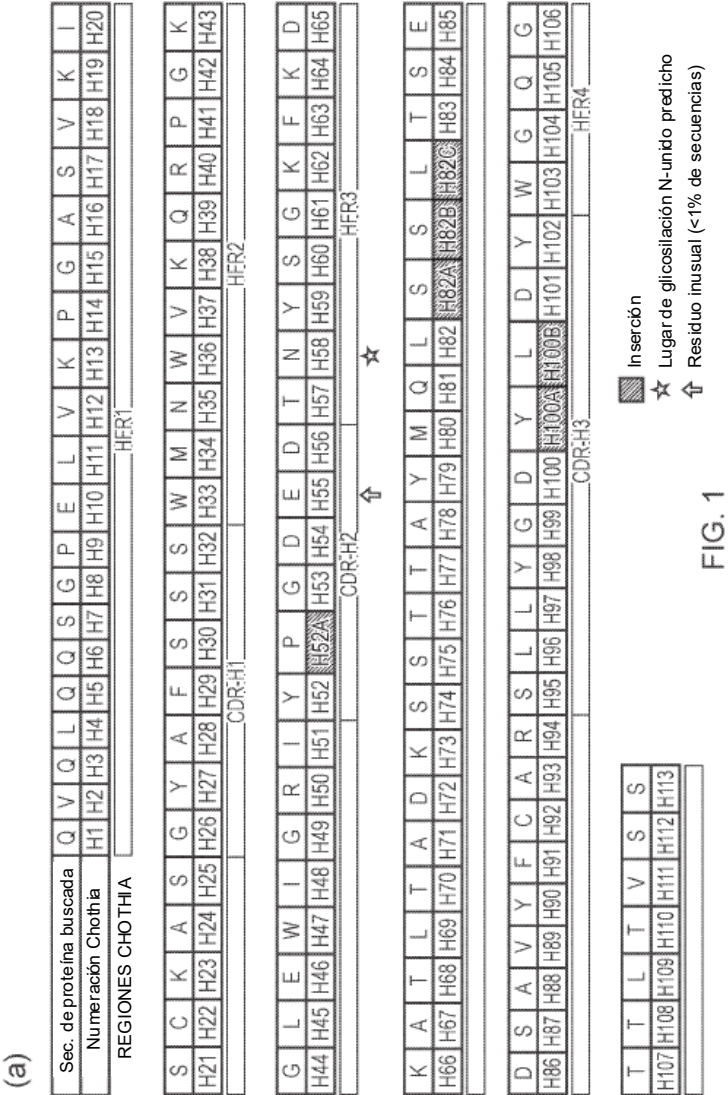
11. Una célula que comprende un CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; preferiblemente en el que la célula es una célula T o una célula asesina natural (NK).

5 12. Una composición celular que comprende una pluralidad de células de acuerdo con la reivindicación 11.

10 13. Un método para fabricar (i) una célula de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende la etapa de transducir o transfectar una célula con un vector de acuerdo con la reivindicación 10; o (ii) una composición celular de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende la etapa de transducir o transfectar una muestra de células de un sujeto ex vivo con un vector de acuerdo con la reivindicación 10.

15 14. Una composición farmacéutica que comprende una célula de acuerdo con la reivindicación 11, o una composición celular de acuerdo con la reivindicación 12, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 15. Una célula de acuerdo con la reivindicación 11, una composición celular de acuerdo con la reivindicación 12 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 para uso en el tratamiento del cáncer, preferiblemente en la que el cáncer es una neoplasia maligna de células B.



(b)

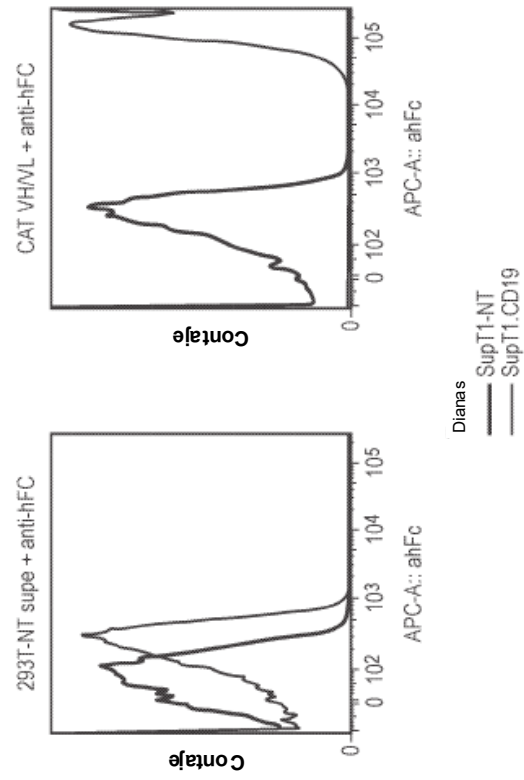
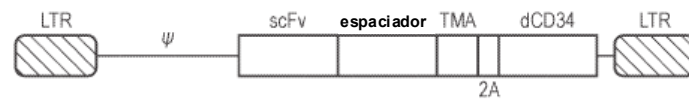


FIG. 2

(a)



(b)

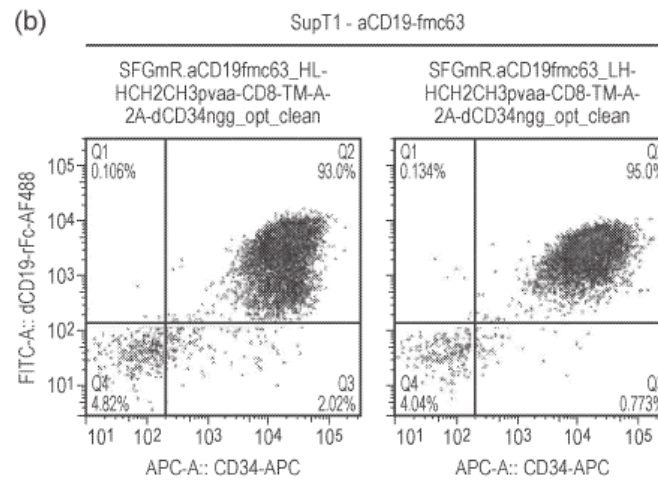


FIG. 3

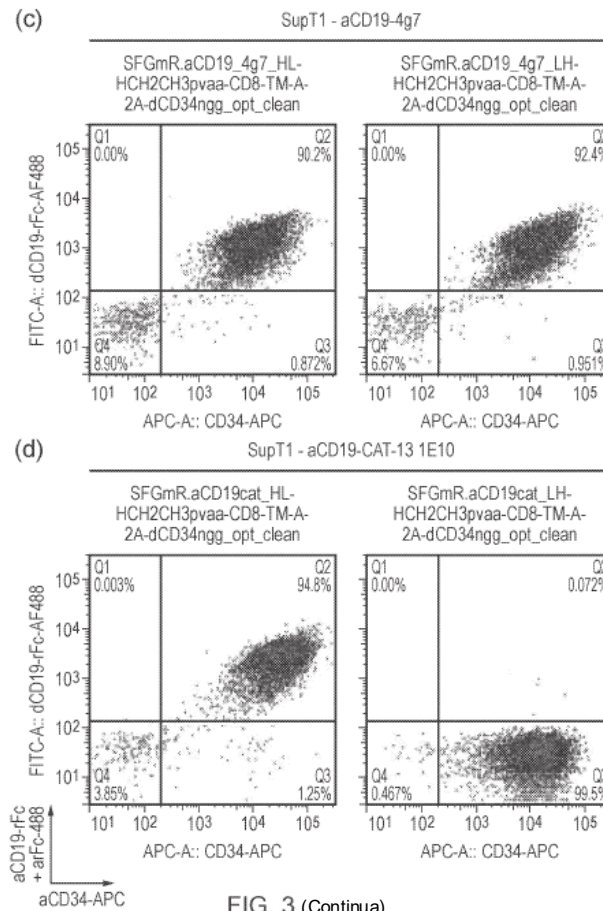
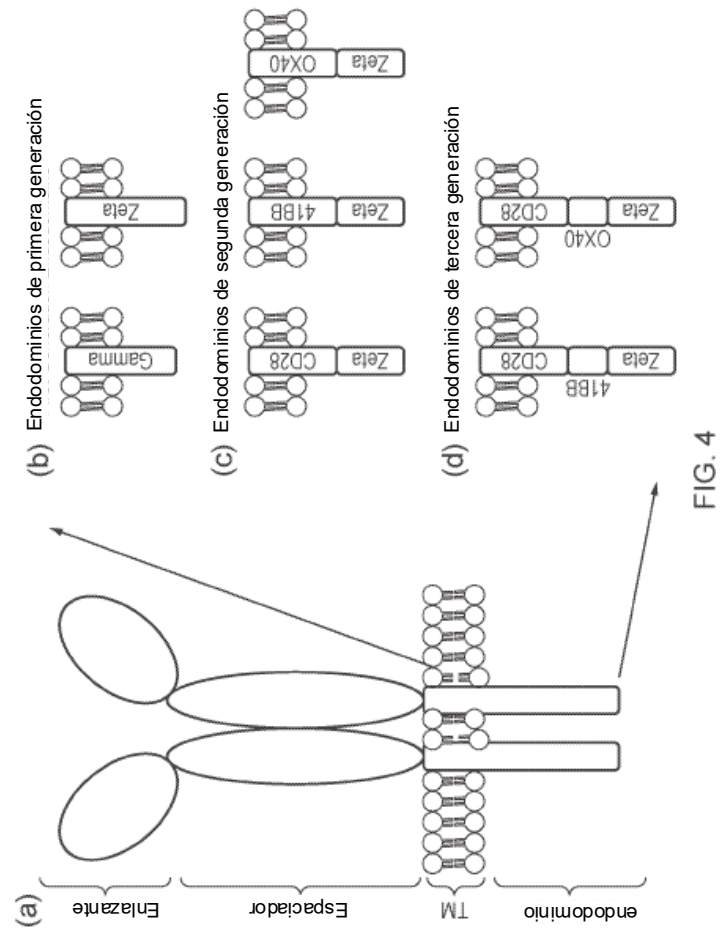


FIG. 3 (Continua)



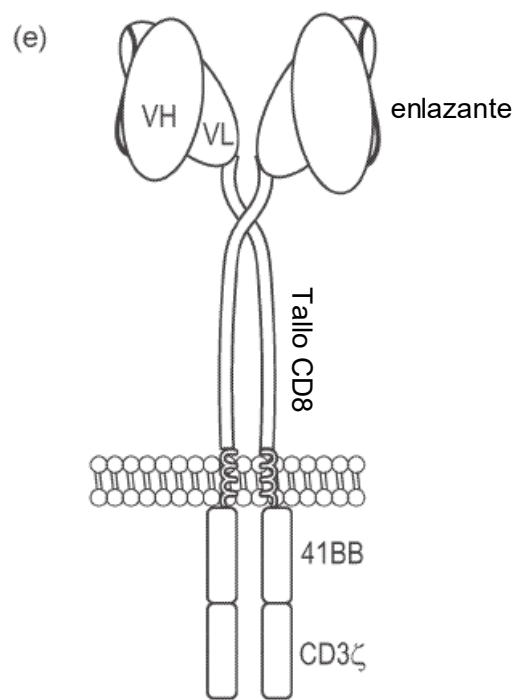


FIG. 4 (continua)

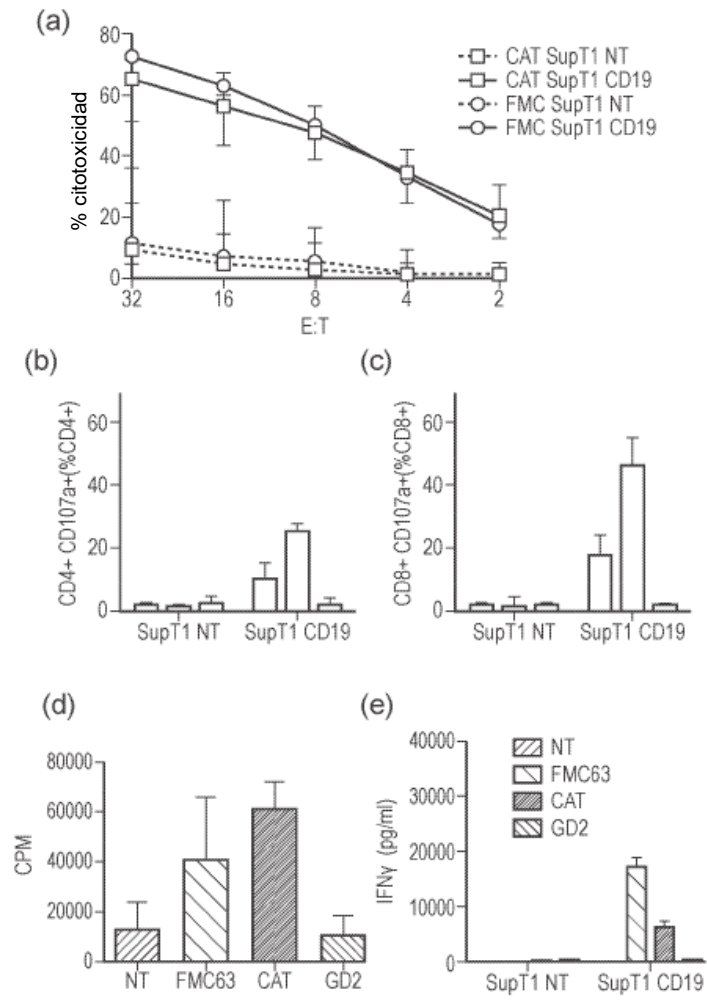


FIG. 5

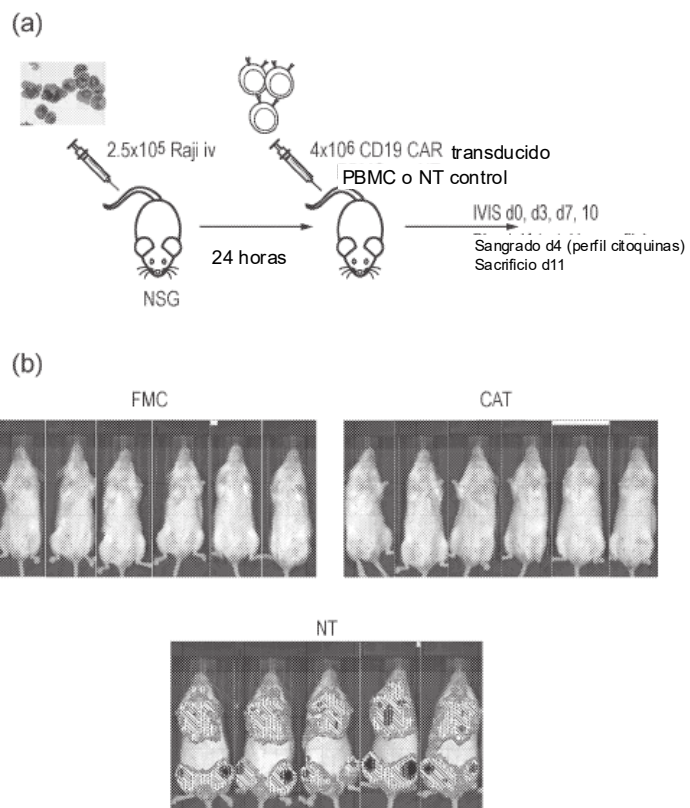
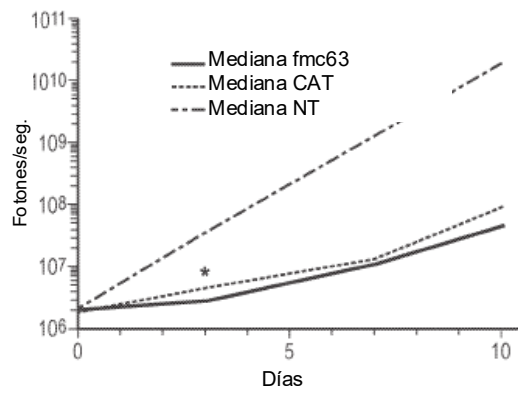


FIG. 6

(c)



(d)

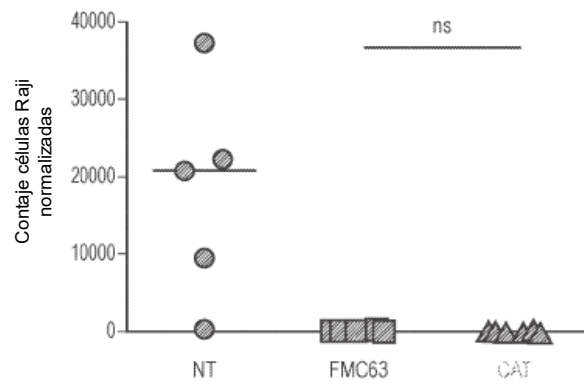


FIG. 6 (Continua)

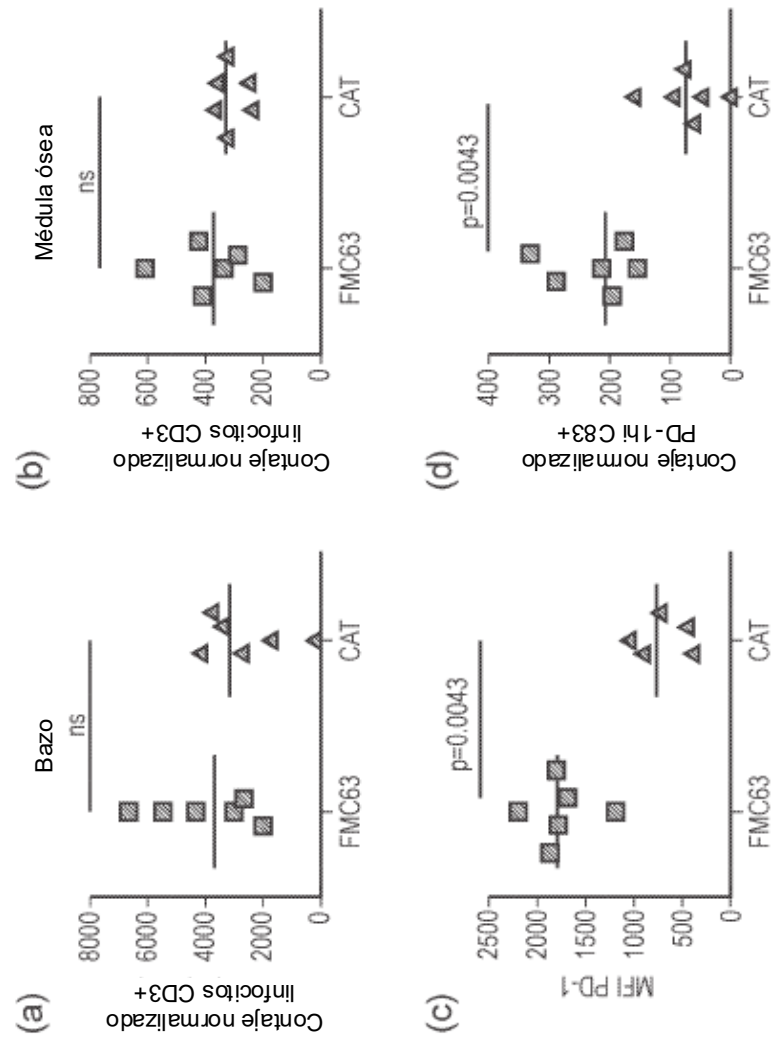


FIG. 7