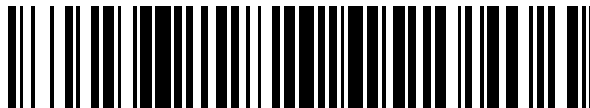


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 910**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2015 PCT/GB2015/054137**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16102965**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015 E 15817520 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3237442**

54 Título: **Célula**

30 Prioridad:

24.12.2014 GB 201423172

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2020

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS LTD (50.0%)
The Network Building, 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB y
AUTOLUS LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PULÉ, MARTIN;
CORDOBA, SHAUN;
ONUOHA, SHIMOB I y
THOMAS, SIMON**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 744 910 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Célula

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una célula que comprende más de un receptor de antígeno quimérico (CAR).

Antecedentes de la invención

10

Se han descrito una serie de agentes inmunoterapéuticos para su uso en el tratamiento del cáncer, incluyendo los anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAbs), mAbs inmunoconjugados, mAbs radioconjugados y moléculas de unión a linfocitos T bispecíficas.

15 Normalmente, estos agentes inmunoterapéuticos se dirigen a un único antígeno: por ejemplo, Rituximab se dirige a CD20; My-elotarg se dirige a CD33; y Alemtuzumab se dirige a CD52.

20 El antígeno CD19 humano es una glucoproteína de transmembrana de 95 kd que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. CD19 se expresa muy temprano en la diferenciación de linfocitos B y solo se pierde en la diferenciación final de linfocitos B en células plasmáticas. En consecuencia, CD19 se expresa en todas las neoplasias malignas de linfocitos B, aparte del mieloma múltiple. Dado que la pérdida del compartimento de linfocitos B normales es una toxicidad aceptable, CD19 es una diana de CAR atractiva y los estudios clínicos dirigidos a CD19 con CAR han tenido resultados prometedores.

25 La hipótesis de Goldie-Coldman proporciona un problema particular en el campo de la oncología: que describe que el único direccionamiento de un solo antígeno puede dar como resultado el escape del tumor mediante la modulación de dicho antígeno debido a la alta tasa de mutación inherente en la mayoría de los cánceres. Esta modulación de la expresión del antígeno puede reducir la eficacia de las inmunoterapéuticas conocidas, incluidas las que se dirigen a CD19.

30

Por lo tanto, un problema con los agentes inmunoterapéuticos dirigidos contra CD19 es que una neoplasia maligna de linfocitos B puede mutar y volverse negativa a CD19. Esto puede provocar una recaída con cánceres negativos a CD19 que no responden a los agentes terapéuticos dirigidos a CD19. Por ejemplo, en un estudio pediátrico, Grupp *et al.* se documentó que la mitad de todas las recaídas después de la terapia con receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19 para la leucemia linfoblástica aguda B (ALL-B) se debieron a una enfermedad negativa a CD19 (56ª Reunión y exposición anual de la American Society of Hematology). Bipulendu *et al.*, Hematologic Malignancy Reports, current science Inc. 9(1), 2014, desvela CAR contra CD19 y/o CD22, respectivamente. Propone modificar el CAR de CD19, ya que también se dirige a CD22, es decir, crear un CAR bispecifico contra CD19 y CD22.

35

40 Por lo tanto, existe la necesidad de agentes inmunoterapéuticos que sean capaces de dirigirse a más de una estructura de superficie celular para reflejar el patrón complejo de expresión de marcador que está asociado con muchos tipos de cánceres, incluidos los cánceres positivos a CD19.

Receptores de antígeno quiméricos (CAR)

45

Los receptores de antígeno quiméricos son proteínas que injertan la especificidad de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (mAb) a la función efectora de un linfocito T. Su forma habitual es la de una proteína de dominio transmembrana de tipo I con un extremo amino terminal que reconoce el antígeno, un espaciador, un dominio transmembrana, todo ello conectado a un endodominio de compuesto que transmite señales de supervivencia y activación de linfocitos T (véase la Figura 1A).

50

La forma más habitual de estas moléculas son fusiones de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales que reconocen un antígeno diana, fusionados mediante un espaciador y un dominio transmembrana a un endodominio de señalización. Dichas moléculas dan como resultado la activación de los linfocitos T en respuesta al reconocimiento por el scFv de su diana. Cuando los linfocitos T expresan dicho CAR, reconocen y eliminan células diana que expresan el antígeno diana. Se han desarrollado varios CAR contra antígenos asociados al tumor, y las estrategias de transferencia adoptiva usando dichos linfocitos T que expresan CAR están actualmente en ensayo clínico para el tratamiento de diversos cánceres.

55

60 Se ha observado que el uso de una estrategia con CAR para el tratamiento del cáncer, la heterogeneidad tumoral y la inmunoección pueden provocar el escape del tratamiento con CAR. Por ejemplo, en el estudio descrito por Grupp *et al.* (2013; New Eng. J. Med 368:1509-1518, art. n.º 380, ASH 2014) la estrategia de linfocitos T con CAR modificado se utilizó para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda B. En ese ensayo clínico se descubrió que 10 pacientes con una remisión completa después de un mes recayeron y 5 de ellos recayeron con enfermedad negativa a CD19.

65

Por lo tanto, existe la necesidad de estrategias de tratamiento alternativas con CAR que aborden los problemas de

escape del cáncer y la heterogeneidad tumoral.

Expresión de dos especificidades de unión de CAR

5 Los CAR biespecíficos conocidos como CAR en tándem o TanCAR se han desarrollado en un intento de dirigirse a múltiples marcadores específicos de cáncer de manera simultánea. En un TanCAR, el dominio extracelular comprende dos especificidades de unión a antígeno en tándem, unidas por un enlazador. Por lo tanto, las dos especificidades de unión (scFvs) están unidas a una sola porción transmembrana: estando un scFv yuxtapuesta a la membrana y estando el otro en posición distal.

10 Grada et al (2013, Mol Ther Nucleic Acids 2: e105) describe un TanCAR que incluye un scFv específico de CD19, seguido de un enlazador de Gly-Ser y luego un scFv específico de HER2. El scFv de HER2 estaba en la posición yuxtapuesta de la membrana, y el scFv de CD19 en la posición distal. Se demostró que el TanCAR induce una reactividad distinta de linfocitos T contra cada uno de los dos antígenos tumorales restringidos. Se eligió esta
15 disposición porque las longitudes respectivas de HER2 (632 aa/125Å) y CD19 (280aa, 65Å) se prestan a esa disposición espacial particular. También se sabía que el scFv de HER2 unía los 4 bucles más distales de HER2.

El problema con esta estrategia es que el scFv yuxtapuesto a la membrana puede ser inaccesible debido a la presencia del scFv distal, que especialmente está unido al antígeno. En vista de la necesidad de elegir las posiciones relativas
20 de los dos scFv en vista de la disposición espacial del antígeno en la célula diana, puede que no sea posible utilizar esta estrategia para todos los pares de unión de scFv. Además, es poco probable que el enfoque TanCar pueda usarse para más de dos scFv, un TanCAR con tres o más scFv sería una molécula muy grande y los scFv pueden plegarse entre sí, ocultando los sitios de unión a antígeno. También es dudoso que la unión al antígeno por el scFv más distal, que está separado del dominio transmembrana por dos o más scFv adicionales, fuese capaz de desencadenar la
25 activación de linfocitos T.

Por lo tanto, existe la necesidad de una estrategia alternativa para expresar dos especificidades de unión a CAR en la superficie de una célula, tal como un linfocito T.

30 Sumario de la invención

Los presentes inventores han desarrollado un linfocito T con CAR que expresa dos CAR en la superficie celular, uno específico para CD19 y uno específico para CD22.

35 Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una célula que coexpresa un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo CAR como moléculas separadas en la superficie celular, comprendiendo cada CAR; un dominio de unión a antígeno; un espaciador; y un dominio transmembrana, en donde el dominio de unión a antígeno del primer CAR se une a CD19 y el dominio de unión a antígeno del segundo CAR se une a CD22.

40 El hecho de que un CAR se une a CD19 y el otro CAR se une a CD22 es ventajoso porque algunos linfomas y leucemias se vuelven negativos a CD19 después del direccionamiento de CD19, (o posiblemente negativo a CD22 después del direccionamiento de CD22), por lo que proporciona un antígeno de "respaldo", si esto ocurriera.

45 La célula puede ser una célula inmunitaria efectora, tal como un linfocito T o linfocito citotóxico natural (NK). Las características mencionadas en el presente documento en relación con un linfocito T se aplican igualmente a otras células inmunitarias efectoras, como las células NK.

Cada CAR puede comprender:

- 50 (i) un dominio de unión a antígeno;
(ii) un espaciador;
(iii) un dominio transmembrana;
(iv) un endodominio.

55 El espaciador del primer CAR puede ser diferente al espaciador del segundo CAR, de tal manera que el primer y el segundo CAR no formen heterodímeros.

El espaciador del primer CAR puede tener una longitud y/o una configuración diferente del espaciador del segundo CAR, de tal manera que cada CAR esté diseñado para el reconocimiento de su respectivo antígeno diana.

60 El dominio de unión a antígeno del segundo CAR puede unirse a un epítipo de membrana distal en CD22. El dominio de unión a antígeno del segundo CAR puede unirse a un epítipo en el dominio de Ig 1, 2, 3 o 4 de CD22, por ejemplo en el dominio Ig 3 de CD22.

65 El dominio de unión a antígeno del primer CAR puede unirse a un epítipo en CD19 que está codificado por el exón 1, 3 o 4.

El endodominio de un CAR puede comprender un dominio coestimulador y un dominio que contiene ITAM; y el endodominio del otro CAR puede comprender un dominio de la familia del receptor de TNF y un dominio que contiene ITAM.

5 Por ejemplo, un CAR (que puede ser específico de CD19 o de CD22) puede tener la estructura: AgB1-espaciador1-TM1-coestim-ITAM en la que:

10 AgB1 es el dominio de unión a antígeno;
el espaciador 1 es el espaciador;
TM1 es el dominio transmembrana;
coestim es un dominio coestimulador; y
ITAM es un endodominio que contiene ITAM;

15 y el otro CAR (que puede ser específico de CD22 o CD19) puede tener la estructura: AgB2-espaciador2-TM2-TNF-ITAM en la que:

20 AgB2 es el dominio de unión a antígeno;
el espaciador 2 es el espaciador;
TM2 es el dominio transmembrana;
TNF es un endodominio del receptor de TNF; y
ITAM es un endodominio que contiene ITAM.

25 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona, una secuencia de ácido nucleico que codifica tanto el primer como el segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) tal como se define en el primer aspecto de la invención.

La secuencia de ácido nucleico puede tener la siguiente estructura:

30 AgB1-espaciador1-TM 1 -coexpr-AgB2-espaciador2-TM2 en la que

35 AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR; el espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;
TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR; coexpr es una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de auto escisión;
AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR; el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR;
TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR;

40 cuya secuencia de ácido nucleico, cuando se expresa en un linfocito T, codifica un polipéptido que se escinde en el péptido de autoescisión de manera que el primer y el segundo CAR se coexpresan en la superficie del linfocito T.

La secuencia de ácido nucleico puede tener la siguiente estructura:

45 AgB1-espaciador1-TM 1-endo1-coexpr-AgB2-espaciador2-TM2-endo2 en la que

50 AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR; el espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;
TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR; endo 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio del primer CAR;
coexpr es una secuencia de ácido nucleico que permite la coexpresión de ambos CAR, AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR; el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR;
55 TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR; endo 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio del segundo CAR;

cuya secuencia de ácido nucleico, cuando se expresa en un linfocito T, codifica un polipéptido que se escinde en el sitio de escisión de modo que el primer y el segundo CAR se coexpresan en la superficie del linfocito T.

60 La secuencia de ácido nucleico que permite la coexpresión de dos CAR puede codificar un péptido que se autoescinde o una secuencia que permite medios alternativos de coexpresión de dos CAR, como una secuencia interna de entrada al ribosoma o un 2º promotor u otro medio similar mediante el cual un experto en la materia puede expresar dos proteínas del mismo vector.

65 Se pueden usar codones alternativos en regiones de secuencia que codifican secuencias de aminoácidos iguales o similares, tales como el dominio de señalización de linfocitos T transmembrana y/o intracelular (endodominio) para

evitar la recombinación homóloga. Por ejemplo, se pueden usar codones alternativos en las porciones de secuencia que codifican el espaciador, el dominio transmembrana y/o todo o parte del endodominio, de modo que los dos CAR tienen las mismas o similares secuencias de aminoácidos para esta o estas partes pero están codificadas por diferentes secuencias de ácido nucleico.

5 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende
(i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el primer receptor de antígeno quimérico (CAR), cuya
10 secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:
AgB1-espaciador1-TM1 en la que

15 AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR;
el espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;
TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR; y

(ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo receptor de antígeno quimérico, cuya
20 secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:
AgB2-espaciador2-TM2

25 AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR;
el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR; y
TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR.

El kit puede comprender

30 (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el primer receptor de antígeno quimérico (CAR), cuya
secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:

AgB1-espaciador1-TM1-endo1 en la que

35 AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR; el
espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;
TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR; endo 1 es
una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio del primer CAR; y

(ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo receptor de antígeno quimérico (CAR), cuya
40 secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:

AgB2-espaciador2-TM2-endo2

45 AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR;
el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR;
TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR;
endo 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio del segundo CAR.

En un cuarto aspecto, la presente invención también proporciona un kit que comprende: un primer vector que
45 comprende la primera secuencia de ácido nucleico; y un segundo vector que comprende la segunda secuencia de
ácido nucleico.

50 Los vectores pueden ser vectores plasmídicos, vectores retrovirales o vectores transposones. Los vectores pueden
ser vectores lentivirales.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico
de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. El vector puede ser un vector lentiviral.

55 El vector puede ser un vector de plásmido, un vector retroviral o un vector de transposón.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para generar una célula de acuerdo con el primer
aspecto de la invención, que comprende la etapa de introducir una o más secuencias de ácido nucleico que codifican
el primer y el segundo CAR; o uno o más vectores, tal como se define anteriormente, en un linfocito T *ex vivo*.

60 La célula puede ser de una muestra aislada de un paciente, un donante de trasplante hematopoyético relacionado o
no relacionado, un donante completamente desconectado, de sangre del cordón umbilical, diferenciado de una línea
celular embrionaria, diferenciado de una línea celular progenitora inducible, o derivado de una línea celular
transformada.

65 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una
pluralidad de células según el primer aspecto de la invención.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con el séptimo aspecto de la invención para tratar y/o prevenir una enfermedad.

5 La composición farmacéutica para su uso puede comprender las siguientes etapas:

- (i) aislamiento de una muestra que contiene células de un sujeto;
- (ii) transducción o transfección de las células con una o más secuencias de ácido nucleico que codifican el primer o el segundo CAR o uno o más vectores que comprenden tales secuencias de ácido nucleico; y
- 10 (iii) administrar las células de (ii) al sujeto.

La enfermedad puede ser cáncer. El cáncer puede ser un tumor maligno de linfocitos B.

La presente invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico que comprende:

- 15 a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un primer receptor de antígeno quimérico (CAR);
- b) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo CAR; en donde un CAR se une a CD19 y el otro CAR se une a CD22; y
- 20 c) una secuencia que codifica un péptido de auto-escisión colocado entre la primera y la segunda secuencia de nucleótidos, de tal manera que los dos CAR se expresen como entidades separadas.

Se pueden usar codones alternativos en una o más porciones de la primera y segunda secuencias de nucleótidos en regiones que codifican la misma secuencia o secuencias de aminoácidos similares.

25 La presente invención también proporciona un vector y una célula que comprende dicho ácido nucleico.

Los presentes inventores también han desarrollado nuevos anti-CAR de CD19 y anti-CAR de CD22 con propiedades mejoradas.

30 Por lo tanto, en el presente documento se describe 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:

- 35 CDR1 - SYWMN (SEQ ID NO. 15);
- CDR2 - QIWPGDGDNTYNGKFK (SEQ ID NO. 16)
- CDR3 - RETTTVGRYYYAMDY (SEQ ID NO. 17); y

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

- 45 CDR1 - KASQSVDYDGDSYLN (SEQ ID NO. 18);
- CDR2 - DASNLVS (SEQ ID NO. 19)
- CDR3 - QQSTEDPWT (SEQ ID NO. 20).

El dominio de unión a CD19 puede comprender un dominio VH que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 23, o la SEQ ID NO 24; o un dominio VL que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 25, la SEQ ID NO. 26 o la SEQ ID NO. 40 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia que conserva la capacidad de unirse a CD19.

50 El dominio de unión a CD19 puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO 21, la SEQ ID NO. 22 o la SEQ ID NO. 39 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia que conserva la capacidad de unirse a CD19.

55 También se describe en el presente documento un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a CD22 que comprende

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

- 60 CDR1 - NYWIN (SEQ ID NO. 27);
- CDR2 - NIYPSDSFTNYNQKFKD (SEQ ID NO. 28)
- CDR3 - DTQERSWYFDV (SEQ ID NO. 29); y

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

CDR1 - RSSQSLVHNSGNTYLH (SEQ ID NO. 30);
CDR2 - KVSNRFS (SEQ ID NO. 31)
CDR3 - SQSTHVPWT (SEQ ID NO. 32).

5 El dominio de unión a CD22 puede comprender un dominio VH que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 35, o la SEQ ID NO 36; o un dominio VL que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 37, o la SEQ ID NO. 38 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia que conserva la capacidad de unirse a CD22.

10 El dominio de unión a CD22 puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 33 o la SEQ ID NO. 34 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia que conserva la capacidad de unirse a CD22.

15 En el presente documento se describe una célula que expresa dicho receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a CD19 o dicho receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a CD22 en la superficie celular.

20 En el presente documento se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a CD19 o dicho receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a CD22.

En el presente documento se describe un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico. El vector puede ser un vector lentiviral.

25 El vector puede ser un vector de plásmido, un vector retroviral o un vector de transposón.

En el presente documento se describe un método para hacer una célula como se describió anteriormente, que comprende la etapa de introducir una o más secuencias de ácido nucleico; o uno o más vectores, tal como se define anteriormente, en una célula.

30 La célula puede ser un linfocito T o una célula citolítica natural (NK). La célula puede ser de una muestra aislada de un paciente, un donante de trasplante hematopoyético relacionado o no relacionado, un donante completamente desconectado, de sangre del cordón umbilical, diferenciado de una línea celular embrionaria, diferenciado de una línea celular progenitora inducible, o derivado de una línea celular transformada.

35 En el presente documento se describe una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células tal como se describió anteriormente.

40 En el presente documento se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad, que comprende la etapa de administrar una composición farmacéutica tal como se describe anteriormente a un sujeto.

El método puede comprender las siguientes etapas:

45 (i) aislamiento de una muestra que contiene células de un sujeto;
(ii) transducción o transfección de las células con una secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR o un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico; y
(iii) administración de las células de (ii) a un sujeto.

50 La enfermedad puede ser cáncer. El cáncer puede ser un tumor maligno de linfocitos B.

En el presente documento se describe una composición farmacéutica como se describe anteriormente para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad.

55 En el presente documento se describe el uso de una célula como se describió anteriormente en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad.

60 También se proporciona una célula de acuerdo con el primer aspecto de la invención, que comprende un primer CAR que comprende un dominio de unión a CD19 tal como se describe anteriormente y un segundo CAR que comprende un dominio de unión a CD22 como se describe anteriormente.

También se proporciona una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, que codifica un primer CAR que comprende un dominio de unión a CD19 tal como se describe anteriormente y un segundo CAR que comprende un dominio de unión a CD22 tal como se describe anteriormente.

65 También se proporciona un kit de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, en donde la primera secuencia de ácido nucleico codifica un primer CAR que comprende un dominio de unión a CD19 tal como se describió anteriormente

y la segunda secuencia de ácido nucleico codifica un segundo CAR que comprende un dominio de unión a CD22 tal como se describió anteriormente.

5 También se proporciona un vector de acuerdo con el quinto aspecto de la invención, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer CAR que comprende un dominio de unión a CD19 como se describió anteriormente y un segundo CAR que comprende un dominio de unión a CD22 como se describe anteriormente.

10 Los presentes inventores han descubierto que, en un sistema de clasificación OR, el rendimiento mejora si el dominio coestimulador y el dominio que produce señales de supervivencia se "dividen" entre los dos (o más) CAR.

15 Así, en el presente documento se describe una célula que coexpresa un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo CAR en la superficie celular, comprendiendo cada CAR un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de señalización intracelular del primer CAR comprende un dominio coestimulador; y el dominio de señalización intracelular del segundo CAR comprende un endodominio de la familia del receptor de TNF.

El dominio coestimulador puede ser un dominio coestimulador de CD28.

El endodominio de la familia del receptor de TNF puede ser, por ejemplo, endodominio OX-40 o 4-1BB.

20 El dominio de señalización intracelular del primer y el segundo CAR también puede comprender un dominio que contiene ITAM, como un endodominio zeta de CD3.

El primer CAR puede tener la estructura:

25 *AgB1 -espaciador1 -TM1 -coestim-ITAM*
en la que:

AgB1 es el dominio de unión a antígeno del primer CAR;

espaciador 1 es el espaciador del primer CAR;

30 *TM1* es el dominio transmembrana del primer CAR;

coestim es un dominio coestimulador; y

ITAM es un endodominio que contiene ITAM.

El segundo CAR puede tener la estructura:

35 *AgB2-espaciador2-TM2- TNF-ITAM* en el cual:

AgB2 es el dominio de unión a antígeno del segundo CAR;

espaciador 2 es el espaciador del segundo CAR;

40 *TM2* es el dominio transmembrana del segundo CAR;

TNF es un endodominio del receptor de TNF; y

ITAM es un endodominio que contiene ITAM.

Un CAR del primer y segundo CAR puede dirigirse a CD19 y otro CAR puede dirigirse a CD22.

45 En el presente documento se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica tanto el primer como el segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) tal como se describe anteriormente.

La secuencia de ácido nucleico puede tener la siguiente estructura:

50 *AgB1-espaciador1-TM1 - coestim- ITAM1-coexpr-AbB2-espaciador2-TM2-TNF-ITAM2*
en la que

AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR; el espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;

TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR; *coestim* es una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador;

55 *ITAM1* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del primer CAR;

coexpr es una secuencia de ácido nucleico que permite la coexpresión de ambos CAR, *AgB2* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR; el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR;

60 *TM2* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR;

TNF es una secuencia de ácido nucleico que codifica un endodominio del receptor de TNF;

ITAM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del segundo CAR.

65 Cuando la secuencia de ácido nucleico se expresa en una célula, puede codificar un polipéptido que se escinde en el sitio de escisión de modo que el primer y el segundo CAR se coexpresan en la superficie celular.

En el presente documento se describe un kit que comprende

(i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el primer receptor de antígeno quimérico (CAR) descrito anteriormente, cuya secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:

AgB1-espaciador1-TM1 - coestim- ITAM1
 en la que

AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR;
 el espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;
 TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR;
 coestim es una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador;
 ITAM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del primer CAR;
 y

(ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) como se describe anteriormente, cuya secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:

AbB2-espaciador2-TM2-TNF-ITAM2

AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR;
 el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR;
 TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR;
 TNF es una secuencia de ácido nucleico que codifica un endodominio del receptor de TNF; y
 ITAM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del segundo CAR.

En el presente documento se describe un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico.

En el presente documento se describe un método para crear una célula como se describió anteriormente, que comprende la etapa de introducir: una secuencia de ácido nucleico tal como se describe anteriormente; una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico tal como se definió anteriormente; o un vector tal como se describió anteriormente, en una célula.

En el presente documento se describe una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células tal como se describió anteriormente.

En el presente documento se describe un método para tratar y/o prevenir una enfermedad, que comprende la etapa de administrar una composición farmacéutica tal como se describe anteriormente a un sujeto.

En el presente documento se describe una composición farmacéutica tal como se describe anteriormente para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

En el presente documento se describe el uso de una célula como se describió anteriormente en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad.

Al proporcionar un CAR que se dirige a CD19 y un CAR que se dirige a CD22, es posible dirigir a cada uno de estos marcadores, reduciendo así el problema de escape de cáncer.

Debido a que los CAR se expresan en la superficie de la célula como moléculas separadas, esta estrategia supera los problemas espaciales y de accesibilidad asociados con los TanCAR. La eficiencia de activación celular también se mejora. Si cada CAR tiene su propio espaciador, es posible adaptar el espaciador y, por lo tanto, la distancia que el dominio de unión proyecta desde la superficie celular y su flexibilidad, etc. al antígeno diana particular. Esta elección no está limitada por las consideraciones de diseño asociadas con los TanCAR, es decir, que un CAR necesita estar yuxtapuesto a la membrana de los linfocitos T y un CAR debe estar distal, colocado en tándem con el primer CAR.

Al proporcionar un solo ácido nucleico que codifica los dos CAR separados por un sitio de escisión, es posible diseñar células para coexpresar los dos CAR utilizando un único procedimiento de transducción simple. Un procedimiento de doble transfección podría usarse con secuencias que codifican CAR en construcciones separadas, pero esto sería más complejo y costoso y requiere más sitios de integración para los ácidos nucleicos. Un procedimiento de doble transfección también se asociaría con la incertidumbre sobre si ambos ácidos nucleicos que codifican CAR han sido transducidos y expresados de manera efectiva.

Los CAR tendrán porciones de alta homología, por ejemplo, es probable que los dominios de señalización transmembrana y/o intracelular sean altamente homólogos. Si se utilizan los mismos enlazadores o similares para los dos CAR, entonces también serán muy homólogos. Esto sugeriría que una estrategia en la que ambos CAR se proporcionan en una sola secuencia de ácido nucleico sería inapropiada, debido a la probabilidad de recombinación homóloga entre las secuencias. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que mediante el "balanceo de codones" de las porciones de secuencia que codifican zonas de alta homología, es posible expresar dos CAR de una sola construcción con alta eficacia. El balanceo de codones implica el uso de codones alternativos en regiones de

secuencia que codifican secuencias de aminoácidos iguales o similares.

Descripción de las figuras

- 5 Figura 1: a) Diagrama esquemático que ilustra un CAR clásico. (b) a (d): Diferentes generaciones y permutaciones de endodominios de CAR: (b) los diseños iniciales transmitían señales ITAM en solitario a través del endodominio FcεR1-γ o CD3ζ, mientras que los diseños posteriores transmitieron (c) una o (d) dos señales coestimuladoras adicionales en el mismo endodominio compuesto.
- 10 Figura 2: Vía de maduración de linfocitos B / ontogenia de linfocitos B. DR = HLA-DR; cCD79 = CD79 citoplasmático; cCD22 = CD22 citoplasmático. Ambos antígenos CD19 y CD22 se expresan durante las primeras etapas de la maduración de linfocitos B. Son estas células las que se convierten en leucemias agudas de linfocitos B. El direccionamiento tanto de CD19 como de CD22 simultáneamente es más adecuado para direccionar las leucemias agudas de linfocitos B.
- 15 Figura 3: Estrategias para el diseño de un casete anti-CAR de CD19 o de CD22. Se seleccionan ligantes que reconocen CD19 y ligantes que reconocen CD22. Se selecciona un dominio espaciador óptimo y un dominio de señalización para cada CAR. (a) se construye un casete de clasificación de OR de modo que ambos CAR se coexpresen usando un péptido FMD-2A. Cualquier secuencia homóloga se balancea por codones para evitar la recombinación. (c) Los dos CAR se coexpresan como proteínas separadas en la superficie de los linfocitos T.
- 20 Figura 4: Ejemplo de balanceo de codones para permitir la coexpresión en un vector retroviral de secuencias peptídicas idénticas pero evitando la recombinación homóloga. En este caso, HCH2CH3-CD28tmZeta de tipo silvestre está alineado con HCH2CH3-CD28tmZeta con balanceo de codones.
- 25 Figura 5: Demostración de la funcionalidad del sistema de clasificación de anti-CAR de CD19 o de CD22. (a) Dibujo de la construcción: S1 - péptido señal 1; HA - marcador de hemaglutina; HCH2CH3 - bisagra, CH2CH3 de la secuencia de IgG1 de tipo silvestre; CD28tmZ - Dominio transmembrana CD28 y secuencia por balanceo de CD3 Zeta; 2A - Péptido 2A de la fiebre aftosa; S2 - péptido señal 2; V5 - marcador de epítipo v5; aCD22 - scFv anti-CD22; HCH2CH3 - bisagra, CH2CH3 de la secuencia por balanceo de IgG1; CD28tmZ: dominio transmembrana CD28 y secuencia por balanceo de CD3 Zeta; (b) Coexpresión de dos receptores de un solo vector. Los linfocitos T de sangre periférica se transdujeron con vector bicistrónico después de la estimulación con OKT3 y anti-CD28. Las células se analizaron cinco días después de la transducción mediante tinción con anti-V5-FITC (invitrogen) y anti-HA-PE (abCam). Los dos CAR se pueden detectar simultáneamente en la superficie de los linfocitos T. (c) Los linfocitos T no transducidos, los linfocitos T que expresan solo anti-CAR de CD19, los linfocitos T que expresan solo anti-CAR de CD22 y los linfocitos T que expresan el sistema de clasificación OR de anti-CAR de CD19 o CD22 se expusieron a células diana que no expresan ni CD19 ni CD22, solo CD19 o CD22 individualmente, o ambos antígenos. Los linfocitos T que expresan anti-CAR de CD19 o de CD22 podrían destruir las células diana incluso si faltara un antígeno.
- 30 Figura 6: Determinación de afinidad de Biacore para scFv de CD22ALAb de murino, scFv de CD22ALAb humanizado y scFv de M971
- 35 Figura 7: Determinación de afinidad de Biacore para scFv de CD19ALAb de murino y CD19ALAb humanizado
- 40 Figura 8: Comparación de la cinética de unión entre la unión de scFv-CD19 soluble a scFv de CD19ALAb y scFv de fmc63
- 45 Figura 9: Diagrama esquemático que ilustra el CAR de CD19ALAb, el CAR de fmc63, el CAR de CD22ALAb y el CAR de M971 utilizados en los estudios comparativos
- 50 Figura 10: Ensayo de eliminación de células diana positivas para CD19 que compara un CAR con un dominio de unión al antígeno CD19ALAb y un CAR equivalente con un dominio de unión a fmc63.
- 55 Figura 11: A) Ensayo de eliminación de células diana positivas para CD22 que compara un CAR con un dominio de unión al antígeno CD22ALAb y un CAR equivalente con un dominio de unión a M971. B) Ensayo que compara la liberación de IFNγ después del cocultivo a 1:1 con células SupT1 CD22 positivas
- 60 Figura 12: Estructura y exones de CD19
- 65 Figura 13: Diagramas esquemáticos y mapas de construcciones que ilustran las cuatro construcciones analizadas en el Ejemplo 5. En el mapa de construcción, las porciones marcadas están balanceadas por codones. A: Ambos CAR de CD19 y de CD22 tienen endodominios compuestos 41BB-CD3zeta; B: Ambos CAR de CD19 y de CD22 tienen endodominios compuestos OX40-CD3zeta; C: El CAR de CD19 tiene endodominio compuesto 41BB-CD3zeta y el CAR de CD22 tiene endodominio compuesto CD28-CD3zeta; y D: el CAR de CD19 tiene endodominio compuesto OX40-CD3zeta y el CAR de CD22 tiene endodominio compuesto CD28-CD3zeta

Figura 14: Eliminación de células diana por células que expresan las construcciones mostradas en la Figura 13.

Descripción detallada

5

RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICOS (CAR)

Los CAR, que se muestran esquemáticamente en la Figura 1, son proteínas de transmembrana quiméricas de tipo I que conectan un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular (ligante) con un dominio de señalización intracelular (endodominio). El ligante es típicamente un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal (mAb), pero puede basarse en otros formatos que comprenden un sitio de unión a antígeno similar a un anticuerpo. Normalmente, es necesario un dominio espaciador para aislar el ligante de la membrana y permitir una orientación adecuada. Un dominio espaciador común utilizado es el Fc de IgG1. Los espaciadores más compactos pueden ser suficientes, por ejemplo, el pedúnculo de CD8 α e incluso solo la bisagra de IgG1 sola, dependiendo del antígeno. Un dominio transmembrana ancla la proteína en la membrana celular y conecta el espaciador al endodominio.

Los primeros diseños de CAR tenían endodominios derivados de las partes intracelulares de la cadena γ y 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 eliminación de los linfocitos T de las células diana relacionadas, pero no pudo activar completamente al linfocito T para proliferar y sobrevivir. Para superar esta limitación, se han construido endodominios compuestos: la fusión de la parte intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T con la de CD3 ζ da como resultado receptores de segunda generación que pueden transmitir una señal activadora y coestimuladora simultáneamente después del reconocimiento de antígeno. El dominio coestimulador más utilizado es el de CD28. Esto suministra la señal coestimuladora más potente, es decir, la señal inmunológica 2, que desencadena la proliferación de linfocitos T. También se han descrito algunos receptores que incluyen los endodominios de la familia de receptores de TNF, tales como los estrechamente relacionados OX40 y 41BB que transmiten señales de supervivencia. Incluso se han descrito CAR más potentes de tercera generación que tienen endodominios capaces de transmitir señales de activación, proliferación y supervivencia.

Los ácidos nucleicos que codifican CAR pueden transferirse a linfocitos T usando, por ejemplo, vectores retrovirales. Se pueden emplear vectores lentivirales. De esta manera, puede generarse una gran cantidad de linfocitos T específicos de cáncer para transferencia celular adoptiva. Cuando el CAR se une al antígeno diana, esto da como resultado la transmisión de una señal de activación al linfocito T en el que se expresa. Por lo tanto, el CAR dirige la especificidad y la citotoxicidad del linfocito T hacia las células tumorales que expresan el antígeno diana.

El primer aspecto de la invención se refiere a una célula que coexpresa un primer CAR y un segundo CAR, en donde un CAR se une a CD19 y el otro CAR se une a CD22, de tal manera que un linfocito T puede reconocer una célula diana que expresa cualquiera de estos marcadores.

Así, los dominios de unión a antígeno del primer y segundo CAR de la presente invención se unen a diferentes antígenos y ambos CAR pueden comprender un endodominio activador. Los dos CAR comprenden dominios espaciadores que pueden ser iguales o suficientemente diferentes para evitar el emparejamiento cruzado de los dos receptores diferentes. Por lo tanto, una célula puede ser diseñada para activarse al reconocer cualquiera o ambos CD19 y CD22. Esto es útil en el campo de la oncología como lo indica la hipótesis de Goldie-Coldman: el único direccionamiento de un solo antígeno puede dar como resultado el escape del tumor mediante la modulación de dicho antígeno debido a la alta tasa de mutación inherente en la mayoría de los cánceres. Al direccionar simultáneamente a dos antígenos, la probabilidad de tal escape se reduce exponencialmente.

Es importante que los dos CAR no se heterodimericen.

El primer y segundo CAR del linfocito T de la presente invención se puede producir como un polipéptido que comprende ambos CAR, junto con un sitio de escisión.

PÉPTIDO SEÑAL

El CAR de la presente invención puede comprender un péptido señal de modo que, cuando el CAR se exprese dentro de una célula, tal como un linfocito T, la proteína nascente se dirija al retículo endoplasmático y posteriormente a la superficie celular, donde se expresa.

El núcleo del péptido señal puede contener un largo tramo de aminoácidos hidrófobos que tiene tendencia a formar una única hélice alfa. El péptido señal puede empezar con un tramo corto de aminoácidos cargado positivamente, que ayuda a garantizar la topología apropiada del polipéptido durante la translocación. Al final del péptido señal normalmente hay un tramo de aminoácidos que reconoce y escinde la peptidasa señal. La peptidasa señal puede escindir durante o después de completarse la translocación, para generar un péptido señal libre y una proteína madura. Después, los péptidos señales libres se digieren por proteasas específicas.

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

El péptido señal puede comprender la SEQ ID NO. 1, 2 o 3 o una variante del mismo que tiene 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones de aminoácidos (inserciones, sustituciones o adiciones) siempre que el péptido señal todavía funcione para causar la expresión del CAR en la superficie celular.

SEQ ID NO. 1: MGTSLLCWMLCCLLGADHADG

El péptido señal de la SEQ ID NO. 1 es compacto y altamente eficaz. Se predice que dará aproximadamente un 95 % de escisión después de la glicina terminal, proporcionando una eliminación eficaz por la peptidasa señal.

SEQ ID NO. 2: MSLPVTALLLPLALLLHAARP

El péptido señal de la SEQ ID NO. 2 deriva de IgG1.

SEQ ID NO. 3: MAVPTQVLGLLLLWLTDARC

El péptido señal de la SEQ ID NO. 3 deriva de CD8.

El péptido señal para el primer CAR puede tener una secuencia diferente del péptido señal del segundo CAR.

CD19

El antígeno CD19 humano es una glucoproteína de transmembrana de 95 kd que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. CD19 se clasifica como una proteína transmembrana de tipo I, con un dominio transmembrana único, un extremo C-terminal citoplasmático y un extremo N-terminal extracelular. La estructura general para CD19 se ilustra en la Figura 12.

CD19 es un biomarcador para linfocitos B normales y neoplásicos, así como para células dendríticas foliculares. De hecho, está presente en los linfocitos B desde las primeras células de linaje B reconocibles durante el desarrollo hasta los blastos de linfocitos B, pero se pierde en la maduración de las células plasmáticas. Actúa principalmente como un correceptor de linfocitos B junto con CD21 y CD81. Tras la activación, la cola citoplasmática de CD19 se fosforila, lo que lleva a la unión de las cinasas de la familia Src y al reclutamiento de la cinasa PI-3. CD19 se expresa muy temprano en la diferenciación de linfocitos B y solo se pierde en la diferenciación final de linfocitos B en células plasmáticas. En consecuencia, CD19 se expresa en todas las neoplasias malignas de linfocitos B, aparte del mieloma múltiple.

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

Tabla 1

| Centro | Ligante | Endodominio | Comentario |
|--|---------|---------------------|--|
| University College London | Fmc63 | CD3-Zeta | Breve persistencia de bajo nivel |
| Memorial Sloane Kettering | SJ25C1 | CD28-Zeta | Persistencia a corto plazo |
| NCI/KITE | Fmc63 | CD28-Zeta | Persistencia de bajo nivel a largo plazo |
| Baylor, Centre for Cell and Gene Therapy | Fmc63 | CD3-Zeta/ CD28-Zeta | Persistencia de bajo nivel a corto plazo |
| UPENN/Novartis | Fmc63 | 41 BB-Zeta | Persistencia de alto nivel a largo plazo |

Tal como se muestra anteriormente, La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha han utilizado un scFv derivado del hibridoma fmc63 como parte del dominio de unión para reconocer CD19.

Como se muestra en la Figura 12, el gen que codifica CD19 comprende diez exones: los exones 1 a 4 codifican el dominio extracelular; el exón 5 codifica el dominio transmembrana; y los exones 6 a 10 codifican el dominio citoplasmático,

En el sistema de clasificación OR de CD19/CD22 de la presente invención, el dominio de unión a antígeno del anti-CAR de CD19 puede unirse a un epítipo de CD19 codificado por el exón 1 del gen CD19.

En el sistema de clasificación OR de CD19/CD22 de la presente invención, el dominio de unión a antígeno del anti-CAR de CD19 puede unirse a un epítipo de CD19 codificado por el exón 3 del gen CD19.

En el sistema de clasificación OR de CD19/CD22 de la presente invención, el dominio de unión a antígeno del anti-CAR de CD19 puede unirse a un epítipo de CD19 codificado por el exón 4 del gen CD19.

CD19ALAb

Los presentes inventores han desarrollado un nuevo anti-CAR de CD19 que tiene propiedades mejoradas en comparación con un anti-CAR de CD19 conocido que comprende el ligante fmc63 (véanse los Ejemplos 2 y 3). El dominio de unión a antígeno del CAR se basa en el ligante de CD19 CD19ALAb, que tiene las regiones CDR y VH/VL identificadas a continuación.

5 En el presente documento se describe 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:

10 CDR1 - SYWMN (SEQ ID NO. 15);
 CDR2 - QIWPGDGDNTYNGKFK (SEQ ID NO. 16)
 CDR3 - RETTTVGRYYYAMDY (SEQ ID NO. 17); y

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

20 CDR1 - KASQSVVDYDGDSYLN (SEQ ID NO. 18);
 CDR2 - DASNLVS (SEQ ID NO. 19)
 CDR3 - QQSTEDPWT (SEQ ID NO. 20).

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

25 El CAR puede comprender una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

SEQ ID NO. 21 (secuencia de scFv CD19ALAb de murino)

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGD
 NYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQG
 TTVTSSDIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDA
 SNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAITYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIK

30 SEQ ID NO. 22 (secuencia de scFv CD19ALAb humanizada - Pesada 19, Kappa 16)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGD
 NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG
 TLVTSSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDA
 SNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

35 SEQ ID NO. 39 (secuencia de scFv CD19ALAb humanizada - Pesada 19, Kappa 7)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGD
 NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG
 TLVTSSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDA
 ASNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYYCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

40 El scFv puede estar en una orientación de VH-VL (tal como se muestra en la SEQ ID No. 21, 22 y 39) o en una orientación de VL-VH.

El CAR puede comprender una de las siguientes secuencias de VH:

SEQ ID NO. 23 (secuencia de VH CD19ALAb de murino)

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIWPGDGDT
 NYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQG
 TTVTSS

SEQ ID NO. 24 (secuencia de VH de CD19ALAb humanizada)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDT
 NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG
 TLVTVSS

5 El CAR puede comprender una de las siguientes secuencias de VL:

SEQ ID NO. 25 (secuencia de VL CD19ALAb de murino)

10 DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGI
 PPRFSGSGSGTDFTLNHPVEKVDAAHYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIK

SEQ ID NO. 26 (secuencia de VL CD19ALAb humanizada, Kappa 16)

15 DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGD SYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO. 40 (secuencia de VL CD19ALAb humanizada, Kappa 7)

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGD SYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

20 El CAR puede comprender una variante de la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 21, 22, 23, 24, 25, 26, 39 o 40 que tienen al menos el 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante conserve la capacidad de unirse a CD19 (cuando esté junto con un dominio VL o VH complementario, si corresponde).

25 El porcentaje de identidad entre dos secuencias polipeptídicas puede determinarse fácilmente por programas tales como BLAST, que está libremente disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

CD22

30 El antígeno CD22 humano es una molécula que pertenece a la familia de lectinas SIGLEC. Se encuentra en la superficie de los linfocitos B maduros y en algunos linfocitos B inmaduros. Hablando en general, CD22 es una molécula reguladora que evita la hiperactivación del sistema inmunitario y el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

35 CD22 es una proteína transmembrana que se une al azúcar, que une específicamente el ácido siálico con un dominio de inmunoglobulina (Ig) ubicado en su extremo N-terminal. La presencia de dominios Ig hace que CD22 sea miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. CD22 funciona como un receptor inhibitor para la señalización del receptor de linfocitos B (BCR).

40 CD22 es una molécula de IgSF que puede existir en dos isoformas, una con siete dominios y una cola intracitoplasmática que comprende tres ITIM (motivos inhibidores basados en tirosina del receptor inmune) y un ITAM; y una variante de corte y empalme que en su lugar comprende cinco dominios extracelulares y una cola intracitoplasmática que lleva un ITIM. Se cree que CD22 es un receptor inhibitor implicado en el control de las respuestas de los linfocitos B al antígeno. Como CD19, CD22 es ampliamente considerado como un antígeno pan-B, aunque se ha descrito la expresión en algunos tejidos no linfoides. El direccionamiento de CD22 con anticuerpos monoclonales terapéuticos e inmunoconjugados ha entrado en pruebas clínicas.

45 Haso et al. describen ejemplos de anti-CAR de CD22. (Blood; 2013; 121(7)). De manera específica, se describen los anti-CAR de CD22 con dominios de unión a antígeno derivados de los scFv m971, HA22 y BL22.

50 El dominio de unión a antígeno del anti-CAR de CD22 puede unirse a CD22 con una K_D en el intervalo de 30-50 nM, por ejemplo 30-40 nM. La K_D puede ser de aproximadamente 32 nM.

CD-22 tiene siete dominios extracelulares de tipo IgG, que comúnmente se identifican como dominio de Ig 1 a dominio de Ig 7, estando el dominio de Ig 7 más próximo a la membrana de los linfocitos B y estando el dominio de Ig 7 más distal de la membrana de las células de Ig (véase Haso et al 2013 tal como se muestra en la Figura 2B).

5 Las posiciones de los dominios de Ig en términos de la secuencia de aminoácidos de CD22 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P20273>) se resumen en la siguiente tabla:

| Dominio de Ig | Aminoácidos |
|---------------|-------------|
| 1 | 20-138 |
| 2 | 143-235 |
| 3 | 242-326 |
| 4 | 331-416 |
| 5 | 419-500 |
| 6 | 505-582 |
| 7 | 593-676 |

10 El dominio de unión a antígeno del segundo CAR puede unirse a un epítipo de membrana distal en CD22. El dominio de unión a antígeno del segundo CAR puede unirse a un epítipo en el dominio de Ig 1, 2, 3 o 4 de CD22, por ejemplo en el dominio Ig 3 de CD22. El dominio de unión a antígeno del segundo CAR puede unirse a un epítipo ubicado entre los aminoácidos 20-416 de CD22, por ejemplo entre los aminoácidos 242-326 de CD22.

15 Los anticuerpos anti-CD22 HA22 y BL22 (Haso et al 2013 como anteriormente) y CD22ALAb, descritos a continuación, se unen a un epítipo en el dominio de Ig 3 de CD22.

El dominio de unión a antígeno del segundo CAR puede no unirse a un epítipo proximal a la membrana en CD22. El dominio de unión a antígeno del segundo CAR puede no unirse a un epítipo en el dominio de Ig 5, 6 o 7 de CD22. El dominio de unión a antígeno del segundo CAR puede no unirse a un epítipo ubicado entre los aminoácidos 419-676 de CD22, tal como entre 505-676 de CD22.

20 CD22ALAb

25 Los presentes inventores han desarrollado un nuevo anti-CAR de CD22 que tiene propiedades mejoradas en comparación con un anti-CAR de CD22 conocido que comprende el ligante m971 (véanse los Ejemplos 2 y 3 y Haso et al (2013) como anteriormente). El dominio de unión a antígeno del CAR se basa en el ligante de CD22 CD22ALAb, que tiene las regiones CDR y VH/VL identificadas a continuación.

30 En el presente documento se describe un CAR que comprende un dominio de unión a CD22 que comprende

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

35 CDR1 - NYWIN (SEQ ID NO. 27);
 CDR2 - NIYPSDSFTNYNQKFKD (SEQ ID NO. 28)
 CDR3 - DTQERSWYFDV (SEQ ID NO. 29); y

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

40 CDR1 - RSSQSLVHNSGNTYLH (SEQ ID NO. 30);
 CDR2 - KVSNRFS (SEQ ID NO. 31)
 CDR3 - SQSTHVPWT (SEQ ID NO. 32).

45 Puede ser posible introducir una o más mutaciones (sustituciones, adiciones o deleciones) en la o cada CDR sin afectar negativamente a la actividad de unión a CD22. Cada CDR puede tener, por ejemplo, una, dos o tres mutaciones de aminoácido.

50 El CAR puede comprender una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO. 33 (secuencia de scFv CD22ALAb de murino)

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRDQTQERSWYFDVWGAGTTVTVSS
DVMVTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK

SEQ ID NO. 34 (secuencia de scFv de CD22ALAb humanizado)

EVQLVESGAIEVKKPGSSVKVSKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
NQKFKDRATLTVDKSTSTAYLELRNLRSDDTAVYYCTRDQTQERSWYFDVWGQGLTVTVSS
DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFS
GVPARFSGSGSGVEFTLTISSLQSEDFAVYYCSQSTHVPWTFGQGTTRLEIK

5

El scFv puede estar en una orientación VH-VL (como se muestra en las SEQ ID NO 33 y 34) o en una orientación VL-VH.

10 El CAR puede comprender una de las siguientes secuencias de VH:

SEQ ID NO. 35 (secuencia de VH CD22ALAb de murino)

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRDQTQERSWYFDVWGAGTTVTVSS

15

SEQ ID NO. 36 (secuencia de VH de CD22ALAb humanizada)

EVQLVESGAIEVKKPGSSVKVSKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
NQKFKDRATLTVDKSTSTAYLELRNLRSDDTAVYYCTRDQTQERSWYFDVWGQGLTVTVSS

20 El CAR de la presente invención puede comprender una de las siguientes secuencias de VL: SEQ ID NO. 37 (secuencia de VL CD22ALAb de murino)

DVMVTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK

25 SEQ ID NO. 38 (secuencia de VL CD22ALAb humanizada)

DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFS
GVPARFSGSGSGVEFTLTISSLQSEDFAVYYCSQSTHVPWTFGQGTTRLEIK

30 El CAR puede comprender una variante de la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 33, 34, 35, 36, 37 o 38 que tienen al menos el 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante conserve la capacidad de unirse a CD22 (cuando esté junto con un dominio VL o VH complementario, si corresponde).

EXPRESIÓN DE ANTIGENO DE LINFOCITOS B DURANTE LA ONTOGENIA DE LINFOCITOS B Y TUMORES POSTERIORES

35

CD19 es ampliamente considerado un antígeno pan-B, aunque muy ocasionalmente, puede mostrar cierta infidelidad de linaje. La molécula CD19 se compone de dos dominios IgSF extracelulares separados por un dominio más pequeño y una larga cola intracitoplasmática, casi tan grande como la porción extracelular de la molécula, que lleva un ITAM. CD19 es una molécula clave en el desarrollo y activación de los linfocitos B. CD22 es una molécula de IgSF que puede existir en dos isoformas, una con siete dominios y una cola intracitoplasmática que comprende tres ITIM (motivos inhibidores basados en tirosina del receptor inmune) y un ITAM; y una variante de corte y empalme que en su lugar

40

comprende cinco dominios extracelulares y una cola intracitoplasmática que lleva un ITIM. Se cree que CD22 es un receptor inhibitor implicado en el control de las respuestas de los linfocitos B al antígeno. Como CD19, CD22 es ampliamente considerado como un antígeno pan-B, aunque se ha descrito la expresión en algunos tejidos no linfoides (Wen et al. (2012) J. Immunol. Baltim. Md 1950 188, 1075-1082). El direccionamiento de CD22 con anticuerpos monoclonales terapéuticos e inmunoconjugados ha entrado en pruebas clínicas. Se ha descrito la generación de CAR específicos para CD22 (Haso et al, 2013, Blood: Volumen 121; 7: 1165-74, y James et al 2008, Journal of immunology, Volumen 180; Número 10; Páginas 7028-38).

Los estudios detallados de inmunofenotipado de las leucemias de linfocitos B muestran que, si bien el CD19 de superficie siempre está presente, el CD22 de superficie está casi siempre presente. Por ejemplo, Raponi et al (2011, como anteriormente) estudiaron el fenotipo del antígeno de superficie de 427 casos de B-ALL y descubrieron CD22 presente en 341 de los casos estudiados.

La eventualidad de la regulación negativa de CD19 después del direccionamiento de CAR19 descrito anteriormente puede explicarse por la hipótesis de Goldie-Coldman. La hipótesis de Goldie-Coldman predice que las células tumorales mutan a un fenotipo resistente a una tasa dependiente de su inestabilidad genética intrínseca y que la probabilidad de que un cáncer contenga clones resistentes depende de la tasa de mutación y del tamaño del tumor. Si bien puede ser difícil para las células cancerosas volverse intrínsecamente resistentes a la eliminación directa de los linfocitos T citotóxicos, la pérdida de antígeno sigue siendo posible. De hecho, este fenómeno se ha informado anteriormente con antígenos de melanoma dirigidos y linfomas dirigidos por EBV. Según la hipótesis de Goldie-Coldman, la mejor posibilidad de curación sería atacar simultáneamente dianas resistentes no cruzadas. Dado que CD22 se expresa en casi todos los casos de B-ALL, el direccionamiento simultáneo de CAR de CD19 junto con CD22 puede reducir la aparición de clones resistentes negativos a CD19.

DOMINIO DE UNIÓN A ANTÍGENO

El dominio de unión al antígeno es la porción del CAR que reconoce el antígeno. Se conocen numerosos dominios de unión a antígeno en la técnica, incluidos los basados en el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, miméticos de anticuerpos y receptores de linfocitos T. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede comprender: un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal; un ligando natural del antígeno diana; un péptido con suficiente afinidad por la diana; un anticuerpo de un solo dominio; un ligante artificial simple como Darpin (proteína repetida de anquirina diseñada); o una cadena sencilla derivada de un receptor de linfocitos T.

El dominio de unión a antígeno del CAR que se une a CD19 puede ser cualquier dominio que sea capaz de unirse a CD19. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede comprender un ligante de CD19 tal como se describe en la Tabla 1.

El dominio de unión a antígeno del CAR que se une a CD19 puede comprender una secuencia derivada de uno de los ligantes de CD19 que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

| Ligante | Referencias |
|---|---|
| HD63 | Pezzutto (Pezzutto, A. et al. J. Immunol. Baltim. Md 1950 138, 2793-2799 (1987) |
| 4 g7 | Meeker et al (Meeker, T. C. et al. Hybridoma 3, 305-320 (1984) |
| Fmc63 | Nicholson et al (Nicholson, I. C. et al. Mol. Immunol. 34, 1157-1165 (1997) |
| B43 | Bejcek et al (Bejcek, B. E. et al. Cancer Res. 55, 2346-2351 (1995) |
| SJ25C1 | Bejcek et al (1995, como anteriormente) |
| BLY3 | Bejcek et al (1995, como anteriormente) |
| B4, o recolocado en superficie, o B4 humanizado | Roguska et al (Roguska, M. A. et al. Protein Eng. 9, 895-904 (1996) |
| HB12b, optimizado y humanizado | Kansas et al (Kansas, G. S. y Tedder, T. F. J. Immunol. Baltim. Md 1950 147, 4094-4102 (1991); Yazawa et al (Yazawa et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 102, 15178-15183 (2005); Herbst et al (Herbst, R. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 335, 213-222 (2010) |

El dominio de unión a antígeno del CAR que se une a CD22 puede ser cualquier dominio que sea capaz de unirse a CD22. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede comprender un ligante de CD22 tal como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3

| <i>Ligante</i> | <i>Referencias</i> |
|--|--|
| M5/44 o M5/44 humanizado | John et al (J. Immunol. Baltim. Md 1950 170, 3534-3543 (2003); y DiJoseph et al (Cancer Immunol. Immunother. CII 54, 11-24 (2005)) |
| M6/13 | DiJoseph et al (como anteriormente) |
| HD39 | Dorken et al (J. Immunol. Baltim. Md 1950 136, 4470-4479 (1986)) |
| HD239 | Dorken et al (como anteriormente) |
| HD6 | Pezzutto et al (J. Immunol. Baltim. Md 1950 138, 98-103 (1987)) |
| RFB-4, o RFB-4 humanizado, o madurado por afinidad | Campana et al (J. Immunol. Baltim. Md 1950 134, 1524-1530 (1985); Krauss et al (Protein Eng. 16, 753-759 (2003), Kreitman et al (J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 30, 1822-1828 (2012)) |
| To15 | Mason et al (Blood 69, 836-840 (1987)) |
| 4KB128 | Mason et al (como anteriormente) |
| S-HCL1 | Schwartz et al (Blood 65, 974-983 (1985)) |
| mIL2 (EPB-2) o mIL2 humanizado - hLL2 | Shih et al (Int. J. Cancer J. Int. Cancer 56, 538-545 (1994)), Leonard et al (J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 21, 3051-3059 (2003)) |
| M971 | Xiao et al (mAbs 1, 297-303 (2009)) |
| BC-8 | Engel et al (J. Exp. Med. 181, 1581-1586 (1995)) |
| HB22-12 | Engel et al (como anteriormente) |

DOMINIO ESPACIADOR

- 5 Los CAR comprenden una secuencia espaciadora para conectar el dominio de unión al antígeno con el dominio transmembrana y separar espacialmente el dominio de unión al antígeno del endodominio. Un espaciador flexible permite que el dominio de unión a antígeno se oriente en diferentes direcciones para posibilitar la unión.

10 En la célula de la presente invención, el primer y el segundo CAR pueden comprender diferentes moléculas espaciadoras. Por ejemplo, la secuencia espaciadora puede comprender, por ejemplo, una región Fc de IgG1, una bisagra IgG1 o un pedúnculo de CD8 humano o el pedúnculo de CD8 de ratón. El espaciador puede comprender, como alternativa, una secuencia enlazadora alternativa que tiene longitud y/o propiedades espaciadoras de dominios similares como una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un pedúnculo de CD8. Un espaciador de IgG1 humana puede alterarse para eliminar los motivos de unión a Fc.

15 El espaciador para el anti-CAR de CD19 puede comprender un espaciador de pedúnculo de CD8, o un espaciador que tiene una longitud equivalente a un espaciador de pedúnculo de CD8. El espaciador para el anti-CAR CD19 puede tener al menos 30 aminoácidos o al menos 40 aminoácidos. Puede tener entre 35-55 aminoácidos, por ejemplo entre 40-50 aminoácidos. Puede tener aproximadamente 46 aminoácidos.

20 El espaciador para el anti-CAR de CD22 puede comprender un espaciador de bisagra de IgG1, o un espaciador que tiene una longitud equivalente a un espaciador de bisagra de IgG1. El espaciador para el anti-CAR de CD22 puede tener menos de 30 aminoácidos o menos de 25 aminoácidos. Puede tener entre 15-25 aminoácidos, por ejemplo entre 18-22 aminoácidos. Puede tener aproximadamente 20 aminoácidos.

25 Los ejemplos de secuencias de aminoácidos para estos espaciadores se dan a continuación:

SEQ ID NO. 4 (bisagra-CH2CH3 de IgG1 humana)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

SEQ ID NO. 5 (pedúnculo de CD8 humano):

TTTTAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

5

SEQ ID NO. 6 (bisagra de IgG1 humana):

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

SEQ ID NO. 7 (ectodominio de CD2)

10

KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSKDKKIAQFRKEKETFKEDTYKLF
 KNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIDYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNG
 TDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTLSAKFKCTAGNKVSKESSVEPVSCP
 EKGLD

SEQ ID NO. 8 (ectodominio de CD34)

SLDNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKF
 TTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATS
 PTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQ
 ADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGLDFTEQDVA
 SHQSYSQKT

15

Dado que los CAR son típicamente homodímeros (véase la Figura 1a), el apareamiento cruzado puede dar como resultado un receptor de antígeno quimérico heterodimérico. Esto no es deseable por varias razones, por ejemplo: (1) el epítipo puede no estar al mismo "nivel" en la célula diana, de modo que un CAR cruzado solo puede unirse a un antígeno; (2) el VH y el VL de los dos scFv diferentes podrían intercambiarse y no reconocer la diana o peor aún reconocer un antígeno inesperado e impredecible. El espaciador del primer CAR puede ser suficientemente diferente del espaciador del segundo CAR para evitar el apareamiento cruzado. La secuencia de aminoácidos del primer espaciador puede compartir menos del 50 %, 40 %, 30% o 20% de identidad a nivel de aminoácidos con el segundo espaciador.

20

DOMINIO TRANSMEMBRANA

El dominio transmembrana es la secuencia del CAR que se extiende por la membrana.

25

Un dominio transmembrana puede ser cualquier estructura de proteína que sea termodinámicamente estable en una membrana. Esto es típicamente una hélice alfa que comprende varios restos hidrófobos. El dominio transmembrana de cualquier proteína transmembrana se puede usar para suministrar la porción transmembrana de la invención. Los expertos en la materia pueden determinar la presencia y la extensión de un dominio transmembrana de una proteína utilizando el algoritmo TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Adicionalmente, dado que el dominio transmembrana de una proteína es una estructura relativamente simple, es decir, una secuencia de polipéptidos prevista para formar una hélice alfa hidrófoba de longitud suficiente para abarcar la membrana, también se puede usar un dominio TM diseñado artificialmente (el documento US 7052906 B1 describe componentes transmembrana sintéticos).

30

35

El dominio transmembrana puede obtenerse de CD28, que da una buena estabilidad de receptor.

El dominio transmembrana puede derivar de la Tyrp-1 humana. La secuencia transmembrana de tyrp-1 se muestra como la SEQ ID NO. 45.

SEQ ID NO. 45
IIAIAWGALLLVALIFGTASYLI

ENDODOMINIO DE ACTIVACIÓN

5 El endodominio es la parte de transmisión de señales del CAR. Después del reconocimiento de antígeno, el grupo de receptores, los CD45 y CD148 naturales se excluyen de la sinapsis y se transmite una señal a la célula. El componente de endodominio más habitualmente usado es el de CD3-zeta que contiene 3 ITAM. Este transmite una señal de activación al linfocito T después de que se una al antígeno. CD3-zeta puede no proporcionar una señal de activación completamente competente y puede necesitarse una señalización coestimuladora adicional. Por ejemplo, pueden usarse CD28 y OX40 quiméricos con CD3-Zeta para transmitir una señal proliferativa/de supervivencia, o pueden usarse los tres conjuntamente.

15 La célula de la presente invención comprende dos CAR, cada uno con un endodominio.

El endodominio del primer CAR y el endodominio del segundo CAR pueden comprender:

- (i) un endodominio que contiene ITAM, tal como el endodominio de CD3 zeta; y/o
- (ii) un dominio coestimulador, tal como el endodominio de CD28; y/o
- 20 (iii) un dominio que transmite una señal de supervivencia, por ejemplo, un endodominio de la familia del receptor de TNF tal como OX-40 o 4-1 BB.

25 En una disposición, los dominios coestimuladores y productores de señales de supervivencia se "comparten" entre los dos (o más) CAR en un sistema de clasificación de OR. Por ejemplo, donde un sistema de clasificación de OR tiene dos CAR, CAR A y CAR B, CAR A puede comprender un dominio coestimulador (por ejemplo, endodominio de CD28) y CAR B puede comprender un endodominio de la familia del receptor TNF, tal como OX-40 o 4-1BB.

30 Un endodominio que contiene un motivo ITAM puede actuar como un endodominio de activación en la presente invención. Se sabe que varias proteínas contienen endodominios con uno o más motivos ITAM. Ejemplos de tales proteínas incluyen la cadena epsilon de CD3, la cadena gamma de CD3 y la cadena delta de CD3, por nombrar algunas. El motivo ITAM puede reconocerse fácilmente como una tirosina separada de una leucina o isoleucina por otros dos aminoácidos, dando la firma YxxL/I. Normalmente, pero no siempre, dos de estos motivos están separados por entre 6 y 8 aminoácidos en la cola de la molécula (YxxL/Ix(6-8)YxxL/I). Por lo tanto, un experto en la materia puede encontrar fácilmente proteínas existentes que contienen uno o más ITAM para transmitir una señal de activación. Adicionalmente, dado que el motivo es simple y no se requiere una estructura secundaria compleja, un experto en la materia puede diseñar polipéptidos que contengan ITAM artificiales para transmitir una señal de activación (véase el documento WO 2000/063372, que se refiere a las moléculas de señalización sintéticas).

40 El dominio de señalización de linfocitos T transmembrana e intracelular (endodominio) de un CAR con un endodominio activador puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 9, 10 u 11 o una variante de las mismas que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia.

SEQ ID NO. 9 que comprende el dominio transmembrana CD28 y el endodominio Z CD3

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLY
45 QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

SEQ ID NO. 10 que comprende el dominio transmembrana CD28 y los endodominios Zeta CD28 y CD3

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
PR

50 SEQ ID NO. 11 que comprende el dominio transmembrana CD28 y los endodominios CD28, OX40 y CD3 Zeta.

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
 RDAAYRSRDQRLPPDAHAKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQG
 QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
 MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5 Una secuencia variante puede tener al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 9, 10, u 11, con la condición de que la secuencia proporcione un dominio transmembrana eficaz y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T eficaz.

"DIVISIÓN" O CLASIFICACIÓN DE LOS ENDODOMINIOS

10 En el presente documento se describe un sistema de clasificación de OR en el que los dominios de señal de coestimulación/supervivencia se "dividen" entre los dos CAR.

15 A este respecto, en el presente documento se describe una célula que coexpresa un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo CAR en la superficie celular, comprendiendo cada CAR un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de señalización intracelular del primer CAR comprende un dominio coestimulador; y el dominio de señalización intracelular del segundo CAR comprende un endodominio de la familia del receptor de TNF.

20 El primer y el segundo CAR pueden unirse a diferentes antígenos. Por ejemplo, el primer CAR se puede unir a CD19 y el segundo CAR se puede unir a CD22; como alternativa, el primer CAR puede unirse a CD22 y el segundo CAR puede unirse a CD19.

25 El dominio de señalización intracelular del primer CAR comprende un dominio coestimulador y no comprende un dominio que transmite señales de supervivencia (como un endodominio de la familia del receptor de TNF). El dominio de señalización intracelular del segundo CAR comprende un endodominio de la familia del receptor de TNF y no comprende un dominio coestimulador (tal como el endodominio CD28).

El dominio coestimulador puede ser un dominio coestimulador de CD28. El dominio coestimulador CD28 puede tener la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 41.

30 SEQ ID NO. 41 (endodominio coestimulador de CD28)
 SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDAAYRS
 El CAR puede comprender una variante de la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 41 con al menos el 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante conserve la capacidad de coestimular los linfocitos T tras el reconocimiento de antígeno, es decir, proporcionar señal 2 a los linfocitos T.
 35 El endodominio de la familia del receptor de TNF puede ser un endodominio OX40 o 4-1BB. El endodominio OX40 puede tener la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 42. El endodominio 4-1BB puede tener la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 43.

40 SEQ ID NO. 42 (endodominio OX40)
 RDQRLPPDAHAKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

45 SEQ ID NO. 43 (endodominio 4-1BB)
 KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCEL
 El CAR puede comprender una variante de la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 42 o 43 con al menos el 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante conserve la capacidad de transmitir una señal de supervivencia a los linfocitos T tras el reconocimiento del antígeno.
 El dominio de señalización intracelular del primer y/o del segundo CAR también puede comprender un dominio que contiene ITAM, tal como un dominio zeta CD3. El dominio zeta CD3 puede tener la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 44.

50 SEQ ID NO. 44 (endodominio CD3zeta)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL
 YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

55 El CAR puede comprender una variante de la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 44 con al menos el 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante conserve la capacidad de inducir la señalización de linfocitos T tras el reconocimiento de antígeno, es decir, proporcionar señal 1 a los linfocitos T.

El primer CAR puede tener la estructura:
AgB1-espaciador1-TM1- coestim-ITAM
en la que:

- 5
- AgB1 es el dominio de unión a antígeno del primer CAR;
el espaciador 1 es el espaciador del primer CAR;
TM1 es el dominio transmembrana del primer CAR;
coestim es un dominio coestimulador; e ITAM es un
10 endodominio que contiene ITAM.
"Coestim" puede ser un dominio coestimulador de CD28.

"ITAM" puede ser un endodominio zeta CD3.

- 15 El segundo CAR puede tener la estructura:
AgB2-espaciador2-TM2-TNF-ITAM
en la que:

- 20 AgB2 es el dominio de unión a antígeno del segundo CAR;
el espaciador 2 es el espaciador del segundo CAR;
TM2 es el dominio transmembrana del segundo CAR;
TNF es un endodominio del receptor de TNF; y
ITAM es un endodominio que contiene ITAM.

- 25 "TNF" puede ser un endodominio del receptor de TNF tal como los endodominios OX40 o 4-1BB.

- También se describe en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica tanto el primer como el
segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) con endodominios "divididos"; y un kit que comprende dos ácidos
nucleicos, uno que codifica un primer CAR y otro que codifica un segundo CAR que comprende endodominios divididos
30 tal como se define anteriormente.

SITIO DE COEXPRESIÓN

- 35 El segundo aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica los primeros y segundos CAR.

El ácido nucleico puede producir un polipéptido que comprende las dos moléculas CAR unidas por un sitio de escisión.
El sitio de escisión puede ser auto escindible, de tal manera que cuando se produce el polipéptido, se escinde
inmediatamente en el primer y el segundo CAR sin la necesidad de ninguna actividad de escisión externa.

- 40 Se conocen varios sitios de autoescisión, incluyendo el péptido 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV) y una secuencia
similar (Donnelly et al, Journal of General Virology (2001), 82, 1027-1041), por ejemplo, como la secuencia de tipo 2A
del virus Thosea asigna que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 12:

SEQ ID NO. 12
RAEGRGSLTTCGDVEENPGP.

- 45 La secuencia que coexpresa puede ser una secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES). La secuencia de
coexpresión puede ser un promotor interno

CÉLULA

- 50 La presente invención se refiere a una célula que coexpresa un primer CAR y un segundo CAR en la superficie celular,
en donde un CAR se une a CD19 y el otro CAR se une a CD22.

- 55 La célula puede ser cualquier célula eucariota capaz de expresar un CAR en la superficie celular, tal como una célula
inmunológica.

En particular, la célula puede ser una célula inmunitaria efectora tal como un linfocito T o una célula citolítica natural
(NK).

- 60 Las células T o los linfocitos T son un tipo de linfocitos que juegan un papel central en la inmunidad mediada por
células. Se pueden distinguir de otros linfocitos, tales como los linfocitos B y las células citolíticas naturales (células
NK), por la presencia de un receptor de linfocitos T (TCR) en la superficie celular. Hay varios tipos de linfocitos T, tal
como se resume a continuación.

- 65 Los linfocitos T colaboradores (linfocitos TH) ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos inmunológicos,
incluyendo la maduración de linfocitos B en células plasmáticas y linfocitos B de memoria, y la activación de linfocitos

T citotóxicos y macrófagos. Los linfocitos TH expresan CD4 en su superficie. Los linfocitos TH se activan cuando las moléculas MHC de clase II les presentan antígenos peptídicos en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Estas células pueden diferenciarse en uno de varios subtipos, incluyendo TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 o TFH, que secretan diferentes citocinas para facilitar diferentes tipos de respuestas inmunitarias.

5 Los linfocitos T citotóxicos (linfocitos TC o CTL) destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Los CTL expresan el CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus dianas al unirse al antígeno asociado con MHC clase I, que está presente en la superficie de todas las células nucleadas. A través de IL-10, adenosina y otras moléculas secretadas por los linfocitos T reguladores, las
10 células CD8+ pueden inactivarse a un estado anérgico, que previene enfermedades autoinmunes tales como la encefalomiелitis autoinmune experimental.

15 Los linfocitos T de memoria son un subconjunto de linfocitos T específicos de antígeno que persisten a largo plazo después de que se resuelve una infección. Se expanden rápidamente a un gran número de linfocitos T efectoras tras la reexposición a su antígeno relacionado, proporcionando así al sistema inmune "memoria" contra infecciones pasadas. Los linfocitos T de memoria comprenden tres subtipos: linfocitos T de memoria central (linfocitos TCM) y dos tipos de linfocitos T efectoras de memoria (linfocitos TEM y linfocitos TEMRA). Los linfocitos de memoria pueden ser CD4+ o CD8+. Los linfocitos T de memoria típicamente expresan la proteína de la superficie celular CD45RO.

20 Los linfocitos T reguladores (linfocitos Treg), anteriormente conocido como linfocitos T supresores, son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Su función principal es detener la inmunidad mediada por linfocitos T hacia el final de una reacción inmune y suprimir linfocitos T autorreactivos que escaparon al proceso de selección negativa en el timo.

25 Se han descrito dos clases principales de linfocitos Treg CD4+: los linfocitos Treg naturales y los linfocitos Treg adaptativos.

30 Los linfocitos Treg de origen natural (también conocidos como linfocitos Treg CD4+CD25+FoxP3+) surgen en el timo y se han relacionado con interacciones entre los linfocitos T en desarrollo con células dendríticas mieloides (CD11c+) y plasmacitoides (CD123+) que se han activado con TSLP. Los linfocitos Treg de origen natural se pueden distinguir de otros linfocitos T por la presencia de una molécula intracelular llamada FoxP3. Las mutaciones del gen FOXP3 pueden prevenir el desarrollo de linfocitos T reguladores, causando la enfermedad autoinmune letal IPEX.

35 Los linfocitos Treg adaptativos (también conocidos como linfocitos Tr1 o linfocitos Th3) pueden originarse durante una respuesta inmunitaria normal.

El linfocito T de la invención puede ser cualquiera de los tipos de linfocitos T mencionados anteriormente, en particular un CTL.

40 Las células citolíticas naturales (NK) son un tipo de célula citolítica que forma parte del sistema inmunitario innato. Las células NK proporcionan respuestas rápidas a las señales innatas de las células infectadas por virus de manera independiente del MHC

45 Las células NK (que pertenecen al grupo de las células linfoides innatas) se definen como linfocitos granulares grandes (LGL) y constituyen el tercer tipo de células diferenciadas del progenitor linfoide común que genera linfocitos B y T. Se sabe que las células NK se diferencian y maduran en la médula ósea, el ganglio linfático, el bazo, las amígdalas y el timo donde luego entran en la circulación.

50 Las células con CAR de la invención pueden ser cualquiera de los tipos de células mencionados anteriormente.

55 Las células que expresan CAR, tales como los linfocitos T o NK que expresan CAR pueden ser creadas *ex vivo* ya sea de la propia sangre periférica del paciente (1ª parte), o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica del donante (2ª parte), o de sangre periférica de un donante no relacionado (3ª parte).

La presente invención también proporciona una composición celular que comprende linfocitos T que expresan CAR y/o células NK que expresan CAR según la presente invención. La composición celular puede hacerse transduciendo una muestra de sangre *ex vivo* con un ácido nucleico según la presente invención.

60 Como alternativa, las células que expresan CAR pueden derivarse de la diferenciación *ex vivo* de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias al tipo de célula relevante, tales como linfocitos T. Como alternativa, se puede usar una línea celular inmortalizada tal como una línea de linfocitos T que conserva su función lítica y podría actuar como un agente terapéutico.

65 En todas estas realizaciones, las células con CAR se generan mediante la introducción de ADN o ARN que codifica los CAR por uno de los muchos medios, incluida la transducción con un vector viral, la transfección con ADN o ARN.

Un linfocito T con CAR de la invención puede ser un linfocito T *ex vivo* de un sujeto. El linfocito T puede ser de una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los linfocitos T pueden activarse y/o expandirse antes de ser transducidos con ácido nucleico que codifica CAR, por ejemplo mediante tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD3.

Un linfocito T con CAR de la invención puede hacerse mediante:

- (i) aislamiento de una muestra que contiene linfocitos T de un sujeto u otras fuentes enumeradas anteriormente; y
- (ii) transducción o transfección de los linfocitos T con una o más secuencias de ácido nucleico que codifican el primer y el segundo CAR.

Los linfocitos T pueden entonces purificarse, por ejemplo, seleccionado sobre la base de la coexpresión del primer y segundo CAR.

SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO

El segundo aspecto de la invención se refiere a una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un primer CAR y un segundo CAR tal como se define en el primer aspecto de la invención.

La secuencia de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, una secuencia de ARN, una de ADN o una de ADNc.

La secuencia de ácido nucleico puede codificar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a CD19 y otro CAR que se une a CD22.

La secuencia de ácido nucleico puede tener la siguiente estructura:
 AgB1-espaciador1-TM 1 -coexpr-AbB2-espaciador2-TM2
 en la que

- AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno de un primer CAR;
- el espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador de un primer CAR;
- TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana de un primer CAR;
- coexpr es una secuencia de ácido nucleico que permite la coexpresión de ambos CAR
- AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno de un segundo CAR;
- el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador de un segundo CAR;
- TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana de un segundo CAR;

cuya secuencia de ácido nucleico, cuando se expresa en un linfocito T, codifica un polipéptido que se escinde en el sitio de escisión de manera que el primer y el segundo CAR se coexpresan en la superficie celular.

El primer CAR se puede unir a CD19 y el segundo CAR se puede unir a CD22. Como alternativa, el primer CAR puede unirse a CD22 y el segundo CAR puede unirse a CD19.

Se pueden usar codones alternativos en regiones de secuencia que codifican secuencias de aminoácidos iguales o similares, para evitar la recombinación homóloga.

Debido a la degeneración del código genético, es posible utilizar codones alternativos que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, los codones "ccg" y "cca" codifican el aminoácido prolina, por lo tanto, el uso de "ccg" puede cambiarse por "cca" sin afectar el aminoácido en esta posición en la secuencia de la proteína traducida.

Los codones de ARN alternativos que pueden usarse para codificar cada aminoácido se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

| | U | C | A | G |
|---|-----------|-----------|-------------|--------------|
| U | UUU } Phe | UCU } Ser | UAU } Tyr | UGU } Cys |
| | UUC } (F) | UCC } (S) | UAC } (Y) | UGC } (C) |
| | UUA } Leu | UCA } | UAA } Ocre | UGA } Ópalo |
| | UUG } (L) | UCG } | UAG } Ámbar | UGG } Trp(W) |

(continuación)

| | U | C | A | G | | | | |
|---|----------------------------------|----------------------|----------------------------------|------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| C | CUU } CUC } CUA } CUG } | Leu (L) | CCU } CCC } CCA } CCG } | Pro (P) | CAU } CAC } CAA } CAG } | His (H) Gln (Q) | CGU } CGC } CGA } CGG } | Arg (R) |
| | AAU } AUC } AUA } AUG } | Ile (I) Met(M) | ACU } ACC } ACG } ACG } | Thr (T) | AAU } AAC } AAA } AAG } | Asn (N) Lys (K) | AGU } AGC } AGA } AGG } | Ser (S) Arg (R) |
| | GUU } GUC } GUA } GUG } | Val (V) | GCU } GCC } GCA } GCG } | Ala (A) | GAU } GAU } GAA } GAG } | Asp (D) Glu (E) | GGU } GGC } GGA } GGG } | Gly (G) |

5 Se pueden usar codones alternativos en las porciones de secuencia de ácido nucleico que codifican el espaciador del primer CAR y el espaciador del segundo CAR, especialmente si se usan espaciadores iguales o similares en el primer y segundo CAR. La Figura 4 muestra dos secuencias que codifican el espaciador HCH2CH3 - bisagra, en uno de los cuales se han usado codones alternativos.

10 Se pueden usar codones alternativos en las porciones de secuencia de ácido nucleico que codifican el dominio transmembrana del primer CAR y la transmembrana del segundo CAR, especialmente si se usan los mismos dominios transmembrana o similares en el primer y segundo CAR. La Figura 4 muestra dos secuencias que codifican el dominio transmembrana CD28, en uno de los cuales se han usado codones alternativos.

15 Se pueden usar codones alternativos en las porciones de secuencia de ácido nucleico que codifican todo o parte del endodominio del primer CAR y todo o parte del endodominio del segundo CAR. Se pueden usar codones alternativos en el endodominio zeta CD3. La Figura 4 muestra dos secuencias que codifican el endodominio zeta CD3, en uno de los cuales se han usado codones alternativos.

Los codones alternativos pueden usarse en uno o más dominios coestimuladores, tales como el endodominio CD28.

20 Se pueden usar codones alternativos en uno o más dominios que transmiten señales de supervivencia, tales como los endodominios OX40 y 41BB.

25 Se pueden usar codones alternativos en las porciones de secuencia de ácido nucleico que codifican un endodominio CD3zeta y/o las porciones de secuencia de ácido nucleico que codifican uno o más dominios coestimuladores y/o las porciones de secuencia de ácido nucleico que codifican uno o más dominios que transmiten señales de supervivencia.

VECTOR

30 La presente invención también proporciona un vector o kit de vectores que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican CAR. Tal vector se puede usar para introducir la secuencia o secuencias de ácido nucleico en una célula hospedadora para que exprese el primer y el segundo CAR.

35 El vector puede, por ejemplo, ser un plásmido o un vector viral, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral, o un vector basado en transposón o ARNm sintético.

El vector puede tener la capacidad de transfectar o transducir un linfocito T.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene una pluralidad de células que expresan CAR, tales como linfocitos T o células NK de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Las composiciones farmacéuticas generalmente pueden comprender adicionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Dicha formulación puede, por ejemplo, estar en una forma adecuada para infusión intravenosa.

MÉTODO DE TRATAMIENTO

Las células de la presente invención son capaces de eliminar células cancerosas, tales como las células de linfoma de células B. Las células que expresan CAR, tales como linfocitos T, se pueden crear *ex vivo* ya sea de la propia sangre periférica del paciente (1ª parte), o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica del donante (2ª parte), o de sangre periférica de un donante no relacionado (3ª parte). Como alternativa, los linfocitos T con CAR pueden provenir de la diferenciación *ex vivo* de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias a linfocitos T. En estos casos, los linfocitos T con CAR se generan mediante la introducción de ADN o ARN que codifica el CAR por uno de muchos medios, incluida la transducción con un vector viral, la transfección con ADN o ARN.

Las células de la presente invención pueden ser capaces de eliminar células diana, tales como las células cancerosas. La célula diana es reconocible por la expresión de CD19 o CD22.

Tabla 4 - expresión de antígenos linfoides en leucemias linfoides

| | CD19 | CD22 | CD10 | CD7 | CD5 | CD3 | clg μ | slg μ |
|------------------------------|------|------|------|-----|-----|-----|-------|-------|
| Pre-linfocito B temprano | 100 | >95 | 95 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pre-linfocito B | 100 | 100 | >95 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| Pre-linfocito B transicional | 100 | 100 | 50 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| linfocito B | 100 | 100 | 50 | 0 | 0 | 0 | >95 | >95 |
| linfocito T | <5 | 0 | 0 | 100 | 95 | 100 | 0 | 0 |

Tomado de Campana et al. (Immunophenotyping of leukemia. J. Immunol. Métodos 243, 59-75 (2000)). clg μ - cadena pesada de inmunoglobulina citoplasmática; slg μ - cadena pesada de inmunoglobulina de superficie.

La expresión de antígenos linfoides comúnmente estudiados en diferentes tipos de leucemias de linfocitos B refleja estrechamente la de la ontogenia de linfocitos B (véase la Figura 2).

Los linfocitos T de la presente invención pueden usarse para tratar un cáncer, en particular, neoplasias de linfocitos B.

Ejemplos de cánceres que expresan CD19 o CD22 son los linfomas de linfocitos B, incluyendo el linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin; y leucemias de linfocitos B.

Por ejemplo, el linfoma de linfocitos B puede ser un linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), Linfoma folicular, Linfoma de zona marginal (MZL) o linfoma de tejido linfático asociado a la mucosa (MALT), linfoma linfocítico de células pequeñas (superposición con leucemia linfocítica crónica), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de Burkitt, Linfoma primario de linfocitos B mediastínicos primarios (típicos), Linfoma linfoplasmacítico (puede manifestarse como macroglobulinemia de Waldenström), Linfoma nodal de la zona marginal de linfocitos B (NMZL), Linfoma esplénico de la zona marginal (SMZL), Linfoma intravascular de células B grandes, Linfoma de derrame primario, Granulomatosis linfomatoide, Linfoma de linfocitos B grandes rico en histiocitos/linfocitos T o linfoma primario del sistema nervioso central.

La leucemia de linfocitos B puede ser leucemia linfoblástica aguda, Leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, Leucemia prolinfocítica de linfocitos B, precursor de leucemia linfoblástica B o leucemia de células pilosas.

La leucemia de linfocitos B puede ser leucemia linfoblástica aguda.

El tratamiento con los linfocitos T de la invención puede ayudar a prevenir el escape o la liberación de células tumorales que a menudo ocurre con estrategias convencionales.

La invención se describirá adicionalmente a continuación por medio de ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto en la materia a poner en práctica la invención y que de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Prueba de concepto de un sistema de clasificación 'OR' lógico de CD19/CD22

5 Se construyó un sistema de clasificación 'OR' de CAR de CD19 y CD22 mediante la coexpresión de un CAR de CD19
y un CAR de CD22 en el mismo vector. El anti-ligante de CD19 era un scFv derivado del anticuerpo B4 reubicado en
superficie (Roguska et al. (1996) Protein Eng. 9, 895-904), y el anti-ligante de CD22 era un scFv derivado del anticuerpo
10 humanizado RFB4. Se usó un espaciador de bisagra- CH2-CH3 de IgG1 humana para ambos CAR, cuya secuencia
de codificación se apareó por balanceo con codones para evitar la recombinación homóloga por el vector integrante.
El dominio TM en ambos CAR provenía del de CD28, y ambos endodominios de CAR comprendieron CD3-Zeta. Una
vez más, estas secuencias homólogas fueron apareadas por balanceo con codones. La coexpresión se logró clonando
15 los dos CAR en un marco separado por un péptido FMD-2A. La secuencia de ácido nucleico y de aminoácidos de la
construcción de sistema de clasificación 'OR' de CD19/CD22 se muestra como la SEQ ID NO: 13 y 14;
respectivamente.

SEQ ID NO: 13

ES 2 744 910 T3

ATGAGCCTGCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCCAGACCATACCCCTACGAC
GTGCCCGACTACGCCAGCCTGAGCGGAGGCGGGCCAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAG
AAGCCTGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCTGTAAAGGCCAGCGGTACACCTTCACCAGCAACTGGATGCACTGGGTG
AGGCAGGCCCTGGACAGGACTGGAGTGGATGGGCGAGATCGACCCAGCGACAGCTACACCAACTACAACCAG
AAGTTCAAGGGCCGGTGAACATCACCGTGGATAAGAGCGCCAGCACCCGCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGA
AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCAGCAACCCCTACTACTACGCTATGGACTACTGGGGCCAG
GGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGCGCGGAGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGATCTGGCGCGGAGGGAGCGAGATC
GTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCTGTAGCGCCAGCAGC
GGCGTGAATTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGGCCCCCAAGAAGATGGATCTACGACACCAGCAAG
CTGGCCAGCGGCGTGCCCGCCAGATTACAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTG
GAGCCTGAGGATTTCCCGTGTATTATTGCCACCAGAGGGGCGAGCTACACCTTTGGCGCGGGAACAAAGCTGGAG
ATCAAGCGCTCAGATCCACCACGACGCCAGCGCCGACCAACACCGGGCGCCACCATCGCGTGCAGCCCC
CTGTCCCTGCGCCAGAGCGCTGCCGGCCAGCGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGT
GATATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT
ATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTTACGAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTC
TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATG
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA
GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTT
CTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATT
TTAAAAGGTGTCCAGTGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCAGGGGGTCCCTGCGC
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTTCACTATCTATGACATGTCTTGGGTCCGCCAGGTTCGGGGAAAGGG
CTGGAGTGGTCTCATAATAGTAGTGGTGGTGGTACCACCTATTACCCGGACACTGTGAAGGGCCGCTTCACC
ATCTCCCGTGACAATTCGCCAACAACCTCTGGATCTTCAAATGAACAGTCTGCGCGTCGAGGACACGGCTGTCTAT
TATTGTGCGCGTCATAGTGGCTACGGTAGTAGCTACGGGGTTTTGTTTGTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTC
ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTACGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCCAGATGACTCAG
TCTCCGTCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGGTCACCATCACCTGCCGTGCAAGTCAGGACATTAGCAAT
TATTTAAACTGGCTTCAACAGAAAACCGGGGAAAGCCCCGAAGCTCCTGATTTACTACACATCAATCTTACACTCA
GGAGTCCCCTCAGCCTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCGGAA
GATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAACCTGGAAATC
AAACGTTCCGATCCAGCCGAACCAAGAGCCCCGATAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTG
CTGGGAGGCCCCAGCGTGTCTGTCTTCCACCAAGCCAAAGGATACCCTGATGATTAGTAGAACACCCGAAGTG
ACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCGAGGTGAAATTTAATTGGTATGTTGATGGTGTGAAGTG
CACAACGCCAAAACCAACCCAGAGAGGAGCAGTACAATTTACCTATAGAGTCTGTCTGTGCTGACAGTGTCTG
CATCAGGATTGGCTGAACGGAAAAAGAAATACAATGTAAAGTGAAGCAATAAGGCCCTGCCCGCTCCAATTTGAGAAG
ACAATTAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTATACACTGCCACCCAGTAGAGACGAACTGACA
AAGAATCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGATTTTACCCATCTGATATCGCCGTGGAATGGGAATCTAAC
GGCCAGCCCCGAGAATAACTATAAGACAACCCACCAGTGCTGGATAGCGATGGCAGCTTTTTTCTGTATTCTAAG
CTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGAAATGTGTTTAGCTGTAGTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAAT

CACTATAACCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCTGGTGGTGGTGGGA
GGCGTGCTGGCCTGTACTCTCTCCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCTCCCGGGTGAAGTTT
TCTCGCTCTGCCGATGCCCCAGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAATGAACTGAACCTGGGCAGGCGG
GAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGCGAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAACCACGGCGCAAAAATCCC
CAGGAGGGACTCTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCCGAGGCCTATTCAGATCGGCATGAAGGGAGAG
AGAAGACGCGGAAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGATTGTCCACCGCTACAAAAGATACATAATGATGCCCTG
CACATGCAGGCCCTGCCACCCAGATGA

SEQ ID NO: 14

MSLPVTALLLPLALLLHAARPYYPYDVPDYASLSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
SNWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
GSNPYYYAMDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSGVNY
MHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLAGSVPARFSGSGSGTSYSLTISISLEPEDFAVYYCHQRGSYTFGGGT
KLEIKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI FWVLVVGGLVAC
YSLLVTVAFII FWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPGEMGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRAEGRGSL
TCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVR
QVPGKLEWVSYISSGGGTYYPDIVKGRFTISRDNRSRNTLDLQMNLSRVEDTAVYYCARHSGYSSY
GVLFAIWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWL
QQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKL
EIKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NRYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDKPKFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFII FWVR
SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPGEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

5 Para demostrar la coexpresión de ambos CAR, el scFv de cada CAR se marcó con un marcador de epítipo (HA o V5 respectivamente). Este marco único de lectura abierta posterior se clonó en el vector retroviral SFG. Los linfocitos T se transdujeron con este vector y se pudieron detectar ambos CAR en la superficie de los linfocitos T que expresaban el casete mediante tinción con anti-HA y anti-V5 y estudiando la expresión por citometría de flujo.

10 A continuación, los linfocitos T que expresan el sistema de clasificación OR de CAR de CD19 o de CD22 CAR se expusieron a las células diana, expresando ninguno, ambos o un antígeno junto con linfocitos T de control que no expresaban CAR, o solo anti-CAR de CD19 solo, o anti-CAR de CD22 solo. Los presentes inventores descubrieron que los linfocitos T con CAR activados por OR podían eliminar células diana que expresaban uno o ambos antígenos diana (Figura 5).

15 Ejemplo 2 - Identificación y caracterización de CD19ALAb y CD22ALAb

Se identificó un ligante de CD19 (CD19ALAb), se humanizó y se identificaron las afinidades de unión de las IgG y scFv murinas y humanizadas y se compararon con el anti-ligante de CD19 "estándar de oro", fmc63. En paralelo, y se identificó un ligante de CD22 (CD22ALAb), se humanizó y se identificaron las afinidades de unión de las IgG y scFv murinas y humanizadas y se compararon con el anti-ligante de CD22 "estándar de oro", M971.

20 Los experimentos se realizaron en un instrumento Biacore T200 usando HBS-P como tampón de dilución y ejecución. Se utilizó el software de evaluación BIAe- valuation Versión 2.0 para el procesamiento de datos. Para la cinética de unión, el anti-IgG humana en ratón o el anti-IgG de ratón en cabra se acoplaron covalentemente a un Chip Sensor CM5. Se capturaron proteínas de IgG o scFv-Fc, y se inyectaron varias concentraciones de proteína asociada a la interacción sobre la celda de flujo a un caudal de 30 µl/min. Las constantes de velocidad cinética se obtuvieron mediante ajuste de curva de acuerdo con un modelo de unión Langmuir a 1:1. Las diferencias del índice de refracción a granel se restaron usando una celda de flujo de control en blanco en la que el anticuerpo de captura se había inmovilizado al mismo nivel que la superficie activa. Se realizó una sustracción de doble referencia utilizando tampón solo.

30

Los resultados se muestran en las figuras 6 a 8.

5 Los datos muestran que CD22ALAb humanizado tiene una afinidad de unión comparable a CD22 con CD22ALAb murino (Figura 6) y una cinética de unión similar. Tanto el CD22ALAb de murino como el humanizado en un formato scFv tienen una afinidad de unión significativamente mayor a CD22 que el anticuerpo de unión a CD22 estándar de oro, M971 (Figura 6).

10 Aunque se descubrió que la afinidad de unión de CD19ALAb murino y humanizado en un formato de IgG es similar (datos no mostrados), sorprendentemente, se descubrió que la afinidad de unión del CD19ALAb humanizado era mayor que el CD19ALAb murino en un formato de scFv (Figura 7). La afinidad de unión de CD19ALAb es comparable (posiblemente un poco mejor) que la del estándar de oro anti-CD19 Ab, fmc63 (Figura 8).

Ejemplo 3 - Ensayos funcionales comparativos con CAR de CD19ALAb/fmc63 y CAR de CD22ALAb/M971

15 El dominio de unión a antígeno de un CAR puede afectar su función. En este estudio, se crearon CAR que comprenden CD19ALAb y CD22ALAb y se comparó la función con un CAR equivalente que tiene un dominio de unión a antígeno basado en fmc63 o M971.

20 Los CAR que comprenden scFv basados en fmc63 (anti-CD19) y M971 (anti-CD22) pueden considerarse los anticuerpos estándar de oro, ya que ambos CAR están en desarrollo clínico.

25 Los CAR se construyeron y se expresaron basándose en CD19ALAb, fmc63, CD22ALAb y M971. Su estructura se muestra en la Figura 9. Los CAR diferían únicamente en su dominio de unión a antígeno. En todas las construcciones, los dominios de unión se unieron a la membrana con un espaciador de pedúnculo de CD8 y contenían motivos de activación intracelular de 41BB y CD3-zeta.

30 Los retrovirus se produjeron por transfección transitoria de células 293T con plásmidos que codifican los CAR, gag/pol y la proteína de envoltura RD114. Después de 3 días, se recogieron los sobrenadantes y se usaron para transducir PBMC activadas con PHA/IL2 con títulos iguales de retrovirus en placas recubiertas con retronectina. Seis días después de la transducción, la expresión de CAR se confirmó mediante citometría de flujo y las PBMC se cultivaron conjuntamente en una proporción de 1:1 con células CD19 + BFP SupT1 (CAR de fmc63 y CD19ALAb) o células CD22 + BFP SupT1 (CAR de M971 y CD22ALAb). Se analizó la eliminación de células diana tras uno y tres días. También después de uno y tres días, los sobrenadantes se eliminaron y los niveles de interferón- γ se analizaron mediante ELISA.

35 Los resultados se muestran en las Figuras 10 y 11.

40 Como se muestra en la Figura 10, el CAR con un dominio de unión al antígeno CD19ALAb produjo más destrucción de las células diana CD19+ve (Figura 10) tanto en el día 1 como en el día 3, que el CAR equivalente con un dominio de unión de fmc63.

45 Con respecto al CD22, el CAR con un dominio de unión al antígeno CD22ALAb dio más destrucción de las células diana CD22+ve (Figura 11a) después de tres días que el CAR equivalente con un dominio de unión M971. La liberación de IFN γ fue significativamente mayor con el CAR de CD22ALAb que con el CAR de M971 después del mismo período de tiempo.

50 Los CAR que tienen un dominio de unión a antígeno basado en CD19ALAb y CD22ALAb, por lo tanto, tienen propiedades mejoradas en términos de destrucción de células diana que los CAR equivalentes basados en fmc63 y M971.

55 El resultado de CD22ALAb es particularmente sorprendente, dados los hallazgos documentados en Haso et al (2013) como anteriormente. En ese estudio, se hicieron y probaron diferentes anti-CAR de CD22, con dominios de unión basados en los anticuerpos anti-CD22 HA22, BL22 y m971. Los scFvs HA22 y BL22 se unen al dominio de Ig 3 de CD22, mientras que m971 se une dentro del dominio de Ig 5-7 de CD22 (véase también Haso et al (2013) Figura 2B). Se documentó que el CAR derivado de m971 mostró una actividad superior de destrucción de células diana que el CAR derivado de HA22, cuyo hallazgo se atribuye a la importancia del epítipo CD22 dirigido por el CAR (Haso et al (2013) página 1168, último párrafo completo). Se concluye que el direccionamiento a un dominio proximal de membrana de CD22 es "el elemento clave" en el desarrollo de un anti-CAR de CD22 altamente activo (Discusión, último párrafo). Contrariamente a este hallazgo, los datos que se muestran en el presente documento en la Figura 11 demuestran que CD22ALAb, que se dirige a un epítipo en el dominio de Ig 3 de CD22, un epítipo "distal de membrana" en comparación con el epítipo de dominio de Ig 5-7 dirigido por m971, tiene una capacidad superior de destrucción de células diana que un anti-CAR de CD22 basado en m971.

65 Ejemplo 4 - Investigación de construcciones de sistema de clasificación OR con diferentes combinaciones de endodominio

Se desarrollaron cuatro construcciones de sistema de clasificación de OR tal como se muestra en la Figura 13. Todos codificaron el sistema de clasificación de OR CD19/CD22 que tienen dominios de unión a antígeno idénticos, dominios espaciadores y dominios transmembrana: la única diferencia entre las construcciones estaba en los endodominios, que se muestran en la siguiente Tabla:

5

| Construcción | endodominio de CAR de CD19 | endodominio de CAR de CD22 |
|--------------|----------------------------|----------------------------|
| A | 41BB-003ζ | 41BB-003ζ |
| linfocito B | OX40-CD3ζ | OX40-CD3ζ |
| C | 41BB-003ζ | CD28-CD3ζ |
| D | OX40-CD3ζ | CD28-CD3ζ |

10

La capacidad de las células que expresan cada sistema de clasificación OR de CD19/CD22 para destruir las células de Raji *in vitro* se ensayó como se describió anteriormente. Las PBMC transducidas que expresan las diversas combinaciones de sistemas de clasificación de OR se cultivaron conjuntamente durante 72 horas con células diana Raji CD19+/CD22+ en una relación de 1:1 y de 1:10 de efector:célula diana.

15

En la figura 14 se muestran los resultados. Se descubrió que los cuatro sistemas de clasificación OR destruyen las células diana significativamente mejor que los CAR de fmc63 y M971. Con la relación efector:diana de 1:10, se demostró que el sistema de clasificación OR de endodominio "dividido", que tienen 4-1BBzeta/OX40zeta en un CAR y CD28zeta en el otro CAR, tuvo la mejor actividad destructiva.

20

Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la invención serán evidentes para los expertos en la materia, sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones preferentes específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe considerarse limitada indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en biología molecular, biología celular o campos relacionados están destinadas a estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

25

<110> UCL Business PLC Autolus Ltd.

<120> CÉLULA

30

<130> P106469PCT

<150> GB 1423172.4

<151> 24-12-2014

35

<160> 49

<170> PatentIn versión 3.5

40

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Péptido señal

<400> 1

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

Asp His Ala Asp Gly
20

50

<210> 2

ES 2 744 910 T3

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

5 <220>
<223> Péptido señal

<400> 2

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

10 His Ala Ala Arg Pro
20

15 <210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido señal

20 <400> 3

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

Asp Ala Arg Cys
20

25 <210> 4
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> secuencia de espaciador, bisagra-CH2CH3 de IgG1 humana

<400> 4

ES 2 744 910 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> 5
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 744 910 T3

<220>

<223> secuencia de espaciador, pedúnculo de CD8 humana

5 <400> 5

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> 6

10 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia de espaciador, bisagra de IgG1 humana

<400> 6

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

20

<210> 7

<211> 185

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> secuencia de espaciador, ectodominio CD2

<400> 7

30

ES 2 744 910 T3

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp
 1 5 10 15

Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp
 20 25 30

Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
 35 40 45

Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp
 180 185

<210> 8
 <211> 259
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> secuencia de espaciador, ectodominio CD34
 <400> 8

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

ES 2 744 910 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Thr

<210> 9
 <211> 140

ES 2 744 910 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> que comprende el dominio transmembrana CD28 y el endodominio Z CD3

<400> 9

```

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 Arg Arg Val Lys Phe
20           25           30

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
35           40           45

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
50           55           60

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
65           70           75           80

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
85           90           95

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
100          105          110

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
115          120          125

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
130          135          140
  
```

10 <210> 10
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> que comprende el dominio transmembrana CD28 y los endodominios Zeta CD28 y CD3

20 <400> 10

```

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 Arg Ser Lys Arg Ser
  
```

ES 2 744 910 T3

| | | |
|--|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
| Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly 35 40 45 | | |
| Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala 50 55 60 | | |
| Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala 65 70 75 80 | | |
| Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg 85 90 95 | | |
| Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu 100 105 110 | | |
| Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn 115 120 125 | | |
| Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met 130 135 140 | | |
| Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly 145 150 155 160 | | |
| Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala 165 170 175 | | |
| Leu Pro Pro Arg 180 | | |

<210> 11

<211> 216

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> que comprende el dominio transmembrana CD28 y los endodominios CD28, OX40 y CD3 Zeta

<400> 11

ES 2 744 910 T3

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

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5

ES 2 744 910 T3

<223> Secuencia tipo 2A

<400> 12

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

Asn Pro Gly Pro
20

5

<210> 13

<211> 3402

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción de sistema de clasificación 'OR' CD19/CD22

15

<400> 13

ES 2 744 910 T3

atgagcctgc cctgaccgc cctgctgctg cccctggccc tgctgctgca cgccgccaga 60
 ccatacccct acgacgtgcc cgactagcc agcctgagcg gaggcggcgg cagccaggtg 120
 cagctggtgc agagcggagc cgaggtgaag aagcctggcg ccagcgtgaa ggtgtcctgt 180
 aaggccagcg gctacacctt caccagcaac tggatgcaact gggtgaggca ggcccctgga 240
 cagggactgg agtggatggg cgagatcgac cccagcgaca gctacaccaa ctacaaccag 300
 aagttcaagg gccgggtgac catcaccgtg gataagagcg ccagcaccgc ctacatggag 360
 ctgtccagcc tgagaagcga ggataccgcc gtgtactact gtgccagagg cagcaacccc 420
 tactactacg ctatggacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc cagcggcggg 480
 ggaggaagcg gagggggcgg atctggcggc ggagggagcg agatcgtgct gaccagagc 540
 cccgccaccc tgagcctgag ccctggcgag agagccaccc tgcctctgtag cgccagcagc 600
 ggcgtgaatt acatgcaact gtatcagcag aagcccggcc agggccccag aagatggatc 660
 tacgacacca gcaagctggc cagcggcgtg cccgccagat tcagcggcag cggctccggc 720
 accagctaca gcctgaccat cagcagcctg gagcctgagg atttcgccgt gtattattgc 780
 caccagaggg gcagctacac ctttggcggc ggaacaaagc tggagatcaa gcgctcagat 840
 cccaccacga cgccagcggc gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc 900
 ctgtccctgc gccagagggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg 960
 ctggacttcg cctgtgatat cttttgggtg ctgggtggtg ttgggtggagt cctggcttgc 1020
 tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagagt gaagttcagc 1080
 aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140
 ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200
 ggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260
 aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgcgggag gggcaagggg 1320
 cacgatggcc ttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgccctcac 1380
 atgcaggccc tgctcctcg cagagccgag ggcaggggaa gtcttctaac atgcggggac 1440
 gtggaggaaa atcccgggcc catggagtgtt gggctgagct ggcttttct tgtggctatt 1500
 ttaaaaggtg tccagtgcga ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtccagcca 1560

ES 2 744 910 T3

ggggggtccc tgcgcctctc ctgtgcagcc tctggattcg ctttcagtat ctatgacatg 1620
 tcttgggtcc gccaggttcc ggggaagggg ctggagtggg tctcatatat tagtagtggg 1680
 ggtggtacca cctattaccg ggacactgtg aagggccgct tcaccatctc ccgtgacaat 1740
 tcccgcaaca ctctggatct tcaaatgaac agtctgcgcg tcgaggacac ggctgtctat 1800
 tattgtgcgc gtcatagtgg ctacggtagt agctacgggg ttttgtttgc ttactggggc 1860
 caaggaaccc tggtcaccgt ctctcaggt ggagggcggt caggcggagg tggctctggc 1920
 ggtggcggat cggacatcca gatgactcag tctccgtcct ccctgtctgc atctgtagga 1980
 gaccgcgtca ccatcacctg ccgtgcaagt caggacatta gcaattattt aaactggctt 2040
 caacagaaac cggggaaagc cccgaagctc ctgatttact acacatcaat cttacactca 2100
 ggagtcccgt cacgcttcag cggcagtgga tctgggacag aattcactct cacaatcagc 2160
 agcctgcagc cgggaagattt tgcaacttat tactgtcaac agggtaatac gcttccgtgg 2220
 acgtttggcc aggggaccaa actggaaatc aaacgttcgg atccagccga accaaagagc 2280
 cccgataaga cccacacctg tccccctgc ccagccccag agctgctggg aggccccagc 2340
 gtgtttctgt ttccacccaa gccaaaggat accctgatga ttagtagaac acccgaagtg 2400
 acctgtgtgg tgggtggatgt gtctcacgag gaccccgagg tgaaatttaa ttggtatggt 2460
 gatggtgttg aagtgcacaa cgccaaaacc aaaccagag aggagcagta caattctacc 2520
 tatagagtcg tgtctgtgct gacagtgctg catcaggatt ggctgaacgg aaaagaatac 2580
 aaatgtaaag tgagcaataa ggccctgccc gctccaattg agaagacaat tagcaaggcc 2640
 aagggccagc caagggagcc ccaggtgtat aactgcccac ccagtagaga cgaactgaca 2700
 aagaatcagc tgtctctgac atgtctggtg aagggatttt acccatctga tatcgccgtg 2760
 gaatgggaat ctaacggcca gcccgagaat aactataaga caaccccacc agtgctggat 2820
 agcgatggca gcttttttct gtattctaag ctgacagtgg ataagtcccg gtggcagcag 2880
 ggaaatgtgt ttagctgtag tgtcatgcat gaggccctgc acaatcacta taccagaaa 2940
 tctctgagtc tgagcccagc caagaaggac cccaagttct gggctctggt ggtggtggga 3000
 ggcgtgctgg cctgttactc tctcctggtg accgtggcct tcatcatctt ttgggtgcgc 3060
 tcccggtga agttttctcg ctctgccgat gcccagcct atcagcaggg ccagaatcag 3120
 ctgtacaatg aactgaacct gggcagcgcg gaggagtacg acgtgctgga taagcggaga 3180
 ggcagagacc ccgagatggg cggcaaacca cggcgcaaaa atccccagga gggactctat 3240
 aacgagctgc agaaggacaa aatggccgag gcctattccg agatcggcat gaagggagag 3300
 agaagacgcg gaaagggcca cgacggcctg tatcagggat tgtccaccgc taaaaagat 3360
 acatatgatg ccctgcacat gcaggccctg ccaccagat ga 3402

<210> 14
 <211> 1133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 744 910 T3

<220>

<223> construcción de sistema de clasificación 'OR' CD19/CD22

5 <400> 14

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

His Ala Ala Arg Pro Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu
 20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 35 40 45

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 50 55 60

Tyr Thr Phe Thr Ser Asn Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr
 85 90 95

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys
 100 105 110

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 115 120 125

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

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val
 165 170 175

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
 180 185 190

Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Gly Val Asn Tyr Met His Trp Tyr
 195 200 205

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser

ES 2 744 910 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 210 | | | | | | 215 | | | | | | | | | | 220 |
| Lys | Leu | Ala | Ser | Gly | Val | Pro | Ala | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | | 240 |
| Thr | Ser | Tyr | Ser | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Glu | Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| Val | Tyr | Tyr | Cys | His | Gln | Arg | Gly | Ser | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | Ser | Asp | Pro | Thr | Thr | Thr | Pro | Ala | Pro | Arg | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| Pro | Pro | Thr | Pro | Ala | Pro | Thr | Ile | Ala | Ser | Gln | Pro | Leu | Ser | Leu | Arg | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| Pro | Glu | Ala | Cys | Arg | Pro | Ala | Ala | Gly | Gly | Ala | Val | His | Thr | Arg | Gly | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| Leu | Asp | Phe | Ala | Cys | Asp | Ile | Phe | Trp | Val | Leu | Val | Val | Val | Gly | Gly | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| Val | Leu | Ala | Cys | Tyr | Ser | Leu | Leu | Val | Thr | Val | Ala | Phe | Ile | Ile | Phe | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| Trp | Val | Arg | Arg | Val | Lys | Phe | Ser | Arg | Ser | Ala | Asp | Ala | Pro | Ala | Tyr | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| Gln | Gln | Gly | Gln | Asn | Gln | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Asn | Leu | Gly | Arg | Arg | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |
| Glu | Glu | Tyr | Asp | Val | Leu | Asp | Lys | Arg | Arg | Gly | Arg | Asp | Pro | Glu | Met | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | |
| Gly | Gly | Lys | Pro | Arg | Arg | Lys | Asn | Pro | Gln | Glu | Gly | Leu | Tyr | Asn | Glu | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | |
| Leu | Gln | Lys | Asp | Lys | Met | Ala | Glu | Ala | Tyr | Ser | Glu | Ile | Gly | Met | Lys | |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| Gly | Glu | Arg | Arg | Arg | Gly | Lys | Gly | His | Asp | Gly | Leu | Tyr | Gln | Gly | Leu | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |
| Ser | Thr | Ala | Thr | Lys | Asp | Thr | Tyr | Asp | Ala | Leu | His | Met | Gln | Ala | Leu | |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |

ES 2 744 910 T3

Pro Pro Arg Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp
 465 470 475 480
 Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe
 485 490 495
 Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu
 500 505 510
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 515 520 525
 Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg
 530 535 540
 Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Gly
 545 550 555 560
 Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 565 570 575
 Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu
 580 585 590
 Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr
 595 600 605
 Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 610 615 620
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 625 630 635 640
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 645 650 655
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
 660 665 670
 Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 675 680 685
 Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 690 695 700
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 705 710 715 720

ES 2 744 910 T3

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn
725 730 735

Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
740 745 750

Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
755 760 765

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
770 775 780

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
785 790 795 800

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
805 810 815

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
820 825 830

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
835 840 845

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
850 855 860

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
865 870 875 880

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
885 890 895

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
900 905 910

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
915 920 925

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
930 935 940

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
945 950 955 960

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
965 970 975

ES 2 744 910 T3

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys
 980 985 990

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 995 1000 1005

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Arg Val
 1010 1015 1020

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 1025 1030 1035

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 1040 1045 1050

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 1055 1060 1065

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 1070 1075 1080

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 1085 1090 1095

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 1100 1105 1110

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
 1115 1120 1125

Ala Leu Pro Pro Arg
 1130

5 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) CDR1 de cadena pesada variable (VH)
 <400> 15

Ser Tyr Trp Met Asn
 1 5

15 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de VH

ES 2 744 910 T3

<400> 16

Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
 1 5 10 15

5

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

10

<220>
 <223> CDR3 de VH

<400> 17

15

Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> CDR1 de cadena ligera variable (VL)

25

<400> 18

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

30

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> CDR2 de VL

<400> 19

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser
 1 5

40

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> CDR3 de VL

50

<400> 20

Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 21

ES 2 744 910 T3

<211> 235
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> receptor de antígeno quimérico (CAR), secuencia de scFv de CD19ALab de murino

<400> 21

```

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
          100          105          110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Asp Ile Gln Leu
          115          120          125

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

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr
145          150          155          160

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
          165          170          175

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
          180          185          190
    
```

10

ES 2 744 910 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys
195 200 205

Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp
210 215 220

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
225 230 235

<210> 22

<211> 236

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> CAR, Secuencia de scFv de CD19ALAb humanizado - Pesada 19, Kappa 16

<400> 22

ES 2 744 910 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Ile Gln Leu
 115 120 125

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

Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr
 145 150 155 160

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 165 170 175

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 180 185 190

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 195 200 205

Ala Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp
 210 215 220

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 225 230 235

<210> 23
 <211> 124

ES 2 744 910 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> CAR, Secuencia de VH de CD19ALAb de murino

<400> 23

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 24
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> CAR, Secuencia de VH de CD19ALAb humanizado

20 <400> 24

ES 2 744 910 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> CAR, Secuencia de VL de CD19ALAb de murino

<400> 25

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

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

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro

ES 2 744 910 T3

50

55

60

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

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR, Secuencia de VL de CD19ALAb humanizado, Kappa6

<400> 26

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

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

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Ala Asp Val Ala Val Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de VH

<400> 27

ES 2 744 910 T3

Asn Tyr Trp Ile Asn
1 5

5 <210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR2 de VH
<400> 28

Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Phe Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

15 <210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CDR3 de VH
<400> 29

Asp Thr Gln Glu Arg Ser Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

25 <210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR1 de VL
<400> 30

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

40 <210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> CDR2 de VL
<400> 31

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

50 <210> 32

ES 2 744 910 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> CDR3 de VL

<400> 32

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

10

<210> 33
<211> 232
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CAR, Secuencia de scFv de CD22ALAb de murino

20 <400> 33

ES 2 744 910 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro
 115 120 125

Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg
 130 135 140

Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp
 145 150 155 160

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 165 170 175

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 180 185 190

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu
 195 200 205

Gly Leu Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly
 210 215 220

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 225 230

<210> 34
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 744 910 T3

<220>

<223> CAR, Secuencia de scFv de CD22ALAb humanizado

<400> 34

5

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
 115 120 125

ES 2 744 910 T3

Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
130 135 140

Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp
145 150 155 160

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val
165 170 175

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
180 185 190

Gly Val Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
225 230

<210> 35
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CAR, Secuencia de VH de CD22ALAb de murino

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 744 910 T3

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 36
- <211> 120
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> CAR, Secuencia de VH de CD22ALAb humanizado
- <400> 36

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 15 <210> 37
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> CAR, Secuencia de VL de CD22ALAb de murino
- <400> 37

ES 2 744 910 T3

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

- <210> 38
- <211> 112
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> CAR, Secuencia de VL de CD22ALAb humanizado
- <400> 38

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

- 15 <210> 39
- <211> 236

ES 2 744 910 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> CAR, Secuencia de scFv de CD19ALAb humanizado - Pesada 19, Kappa 7

<400> 39

```

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100         105         110

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Ile Gln Leu
115         120         125

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

Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr
145         150         155         160

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile
165         170         175

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
180         185         190

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
195         200         205

Ala Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp
210         215         220

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
225         230         235

```

ES 2 744 910 T3

<210> 40
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> CAR, Secuencia de VL de CD19ALAb humanizado, Kappa 7

<400> 40

10

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

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

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Val Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 41
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Endodominio coestimulador CD28

20

<400> 41

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

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

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

25

<210> 42
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 744 910 T3

<220>
 <223> endodominio OX40

5 <400> 42

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

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

Leu Ala Lys Ile
 35

10 <210> 43
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> endodominio 4-1BB

<400> 43

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

20 <210> 44
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> endodominio CD3zeta

30 <400> 44

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

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

ES 2 744 910 T3

20

25

30

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

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

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

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

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

<210> 45
<211> 24
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia transmembrana Tyrp-1

<400> 45

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

Phe Gly Thr Ala Ser Tyr Leu Ile
20

15 <210> 46
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 46

Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu
1 5 10 15

Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr Trp
20 25 30

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

Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe Ile
50 55 60

ES 2 744 910 T3

Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly
65 70 75 80

Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val Glu
85 90 95

Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu
100 105 110

Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser
115 120 125

Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro
130 135 140

Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser Leu
145 150 155 160

Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu
165 170 175

Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu
180 185 190

Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser Leu
195 200 205

Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu Thr
210 215 220

Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr Ala
245 250 255

Arg Pro

- <210> 47
- <211> 4
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> motivo ITAM
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (2)..(3)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>

ES 2 744 910 T3

<221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser leucina o isoleucina

5 <400> 47

Tyr Xaa Xaa Xaa
 1

10 <210> 48
 <211> 1139
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 48

| | |
|--|------|
| atcccgccga gcccaaatct cctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg | 60 |
| aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga | 120 |
| tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg | 180 |
| tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg | 240 |
| aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact | 300 |
| ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg | 360 |
| agaaaacccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc | 420 |
| catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct | 480 |
| atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca accggagaac aactacaaga | 540 |
| ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctccaccgtgg | 600 |
| acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcac gaggctctgc | 660 |
| acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaaaaagat cccaaatfff | 720 |
| gggtgctggt ggtggttggg ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta acagtggcct | 780 |
| ttattatfff ctgggtgagg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc | 840 |
| agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg | 900 |
| ttttggacia gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc | 960 |
| ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga | 1020 |
| ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctctca | 1080 |
| gtacagccac caagacacc tacgacgcc ttcacatgca ggcctgcct cctcgcgag | 1139 |

20 <210> 49
 <211> 1139
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> HCH2CH3-CD28tmZeta con balanceo de codones

<400> 49

ES 2 744 910 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| atccagccga | accaaagagc | cccgataaga | cccacacctg | tccccctgc | ccagccccag | 60 |
| agctgctggg | aggccccagc | gtgtttctgt | ttccacccaa | gccaaaggat | accctgatga | 120 |
| ttagtagaac | acccgaagtg | acctgtgtgg | tggtggatgt | gtctcacgag | gacccccagg | 180 |
| tgaaatttaa | ttggtatggt | gatggtgttg | aagtgcacaa | cgccaaaacc | aaaccagag | 240 |
| aggagcagta | caattctacc | tatagagtgc | tgtctgtgct | gacagtgctg | catcaggatt | 300 |
| ggctgaacgg | aaaagaatac | aatgtaaag | tgagcaataa | ggcctgccc | gctccaattg | 360 |
| agaagacaat | tagcaaggcc | aaggccagc | caaggagacc | ccaggtgtat | aaactgccac | 420 |
| ccagtagaga | cgaactgaca | aagaatcagg | tgtctctgac | atgtctggtg | aagggatttt | 480 |
| acccatctga | tatcgccgtg | gaatgggaat | ctaacggcca | gcccgagaat | aactataaga | 540 |
| caaccccacc | agtgctggat | agcgatggca | gcttttttct | gtattctaag | ctgacagtgg | 600 |
| ataagtcccg | gtggcagcag | ggaaatgtgt | ttagctgtag | tgtcatgcat | gaggccctgc | 660 |
| acaatcacta | taccagaaa | tctctgagtc | tgagcccagg | caagaaggac | cccaagttct | 720 |
| gggtcctggg | ggtggtggga | ggcgtgctgg | cctgttactc | tctcctggtg | accgtggcct | 780 |
| tcatcatctt | ttgggtgctg | tcccgggtga | agttttctcg | ctctgccgat | gccccagcct | 840 |
| atcagcaggg | ccagaatcag | ctgtacaatg | aactgaacct | gggcaggcgg | gaggagtacg | 900 |
| acgtgctgga | taagcggaga | ggcagagacc | ccgagatggg | cggcaaacca | cggcgcaaaa | 960 |
| atccccagga | gggactctat | aacgagctgc | agaaggacaa | aatggccgag | gcctattccg | 1020 |
| agatcggcat | gaaggagag | agaagacgcg | gaaagggcca | cgacggcctg | tatcagggat | 1080 |
| tgtccaccgc | tacaaaagat | acatatgatg | ccctgcacat | gcaggccctg | ccaccaga | 1139 |

REIVINDICACIONES

1. Una célula que coexpresa un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo CAR como moléculas separadas en la superficie celular, comprendiendo cada CAR: un dominio de unión a antígeno; un espaciador; y un dominio transmembrana en el que el dominio de unión a antígeno del primer CAR se une a CD19 y el dominio de unión a antígeno del segundo CAR se une a CD22.
2. Una célula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el espaciador del primer CAR es diferente al espaciador del segundo CAR.
3. Una célula de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el dominio de unión a antígeno del segundo CAR se une a un epítipo en el dominio de Ig 1, 2, 3 o 4 de CD22.
4. Una secuencia de ácido nucleico que codifica tanto el primer como el segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene la siguiente estructura:
AgB1-espaciador1 -TM1 -coexpr-AgB2-espaciador2-TM2
en la que
- AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR;
el espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;
TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR;
coexpr es una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de auto escisión;
- AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR;
el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR;
TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR;
- cuya secuencia de ácido nucleico, cuando se expresa en un linfocito T, codifica un polipéptido que se escinde en el péptido de autoescisión de manera que el primer y el segundo CAR se coexpresan en la superficie del linfocito T.
6. Un kit que comprende
- (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el primer receptor de antígeno quimérico (CAR) tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuya secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:
AgB1-espaciador1-TM1
en la que
- AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR;
el espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;
TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR;
y
- (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuya secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:
AgB2-espaciador2-TM2
- AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR;
el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR; y
TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR.
7. Un kit que comprende: un primer vector que comprende la primera secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 6; y un segundo vector que comprende la segunda secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 6.
8. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o 5.
9. Un método para crear una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de introducir: una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o 5; una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 6; y/o un primer vector y un segundo vector tal como se define en la reivindicación 7 o un vector según la reivindicación 8, en una célula *ex vivo*.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la célula es de una muestra aislada de un sujeto.

11. Una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 5 12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad.
13. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende las siguientes etapas:
- 10 (i) aislamiento de una muestra que contiene células de un sujeto;
- (ii) transducción o transfección de las células con: una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o 5; una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 6; un primer vector y un segundo vector tal como se define en la reivindicación 7 o un vector según la reivindicación 8; y
- 15 (iii) administración de las células de (ii) a un sujeto.
14. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde la enfermedad es un cáncer.
- 20 15. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer es una neoplasia maligna de linfocitos B.

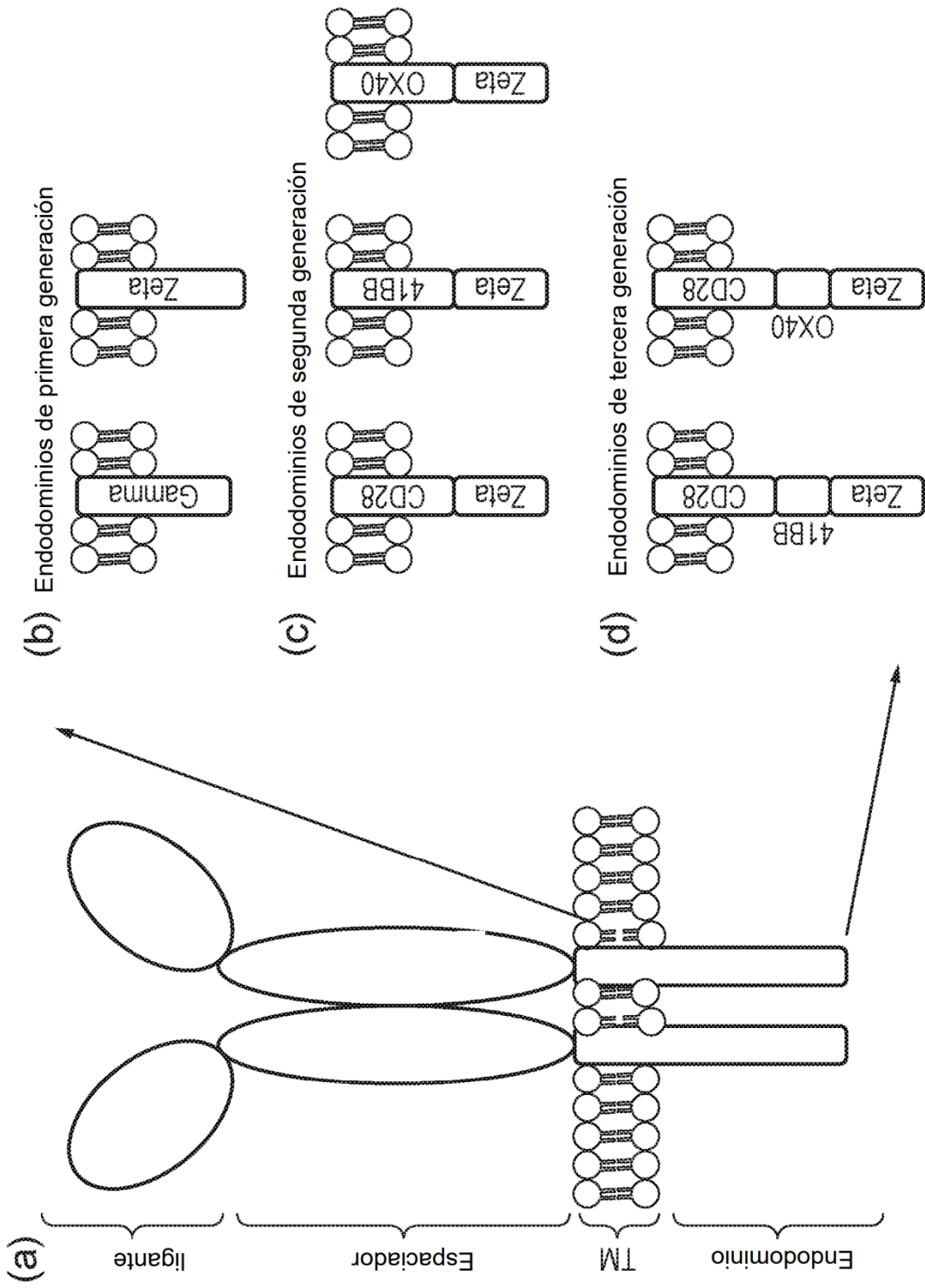


FIG. 1

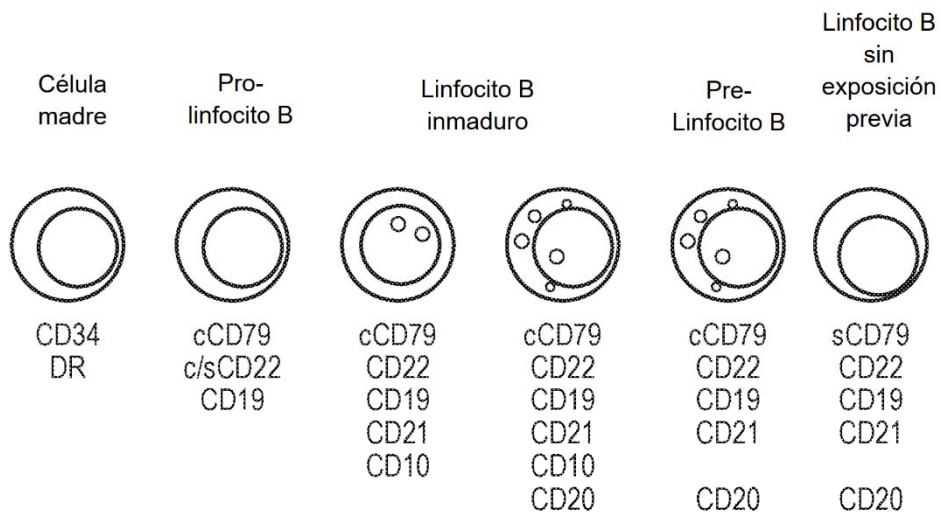
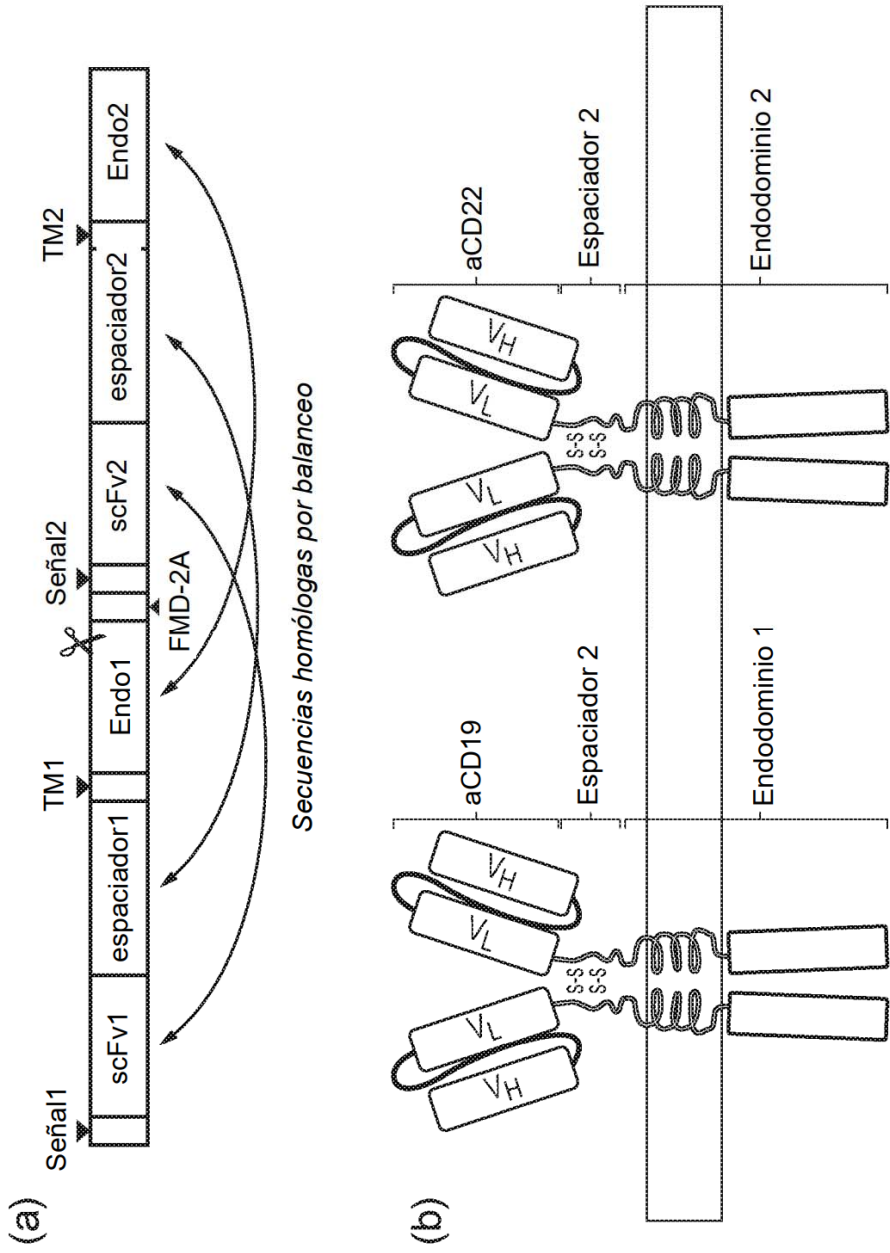


FIG. 2



Anti-CAR de CD22

Anti-CAR de CD19

FIG. 3

1 atcddgcccagaccdaaatctcctgaaaaalaacacacatgcccacagtgcccaagcaccctgaactcttggggggggaacagcttcaptcttctctcttcccaccaaa
 2 atcagccgaaacaaagagccagataaagacacacactgtcccacagtgcccaagcaccctgaactcttggggggggaacagcttcaptcttctctcttcccaccaaa
 101 accaaaggaaaccctatgatctccgggaacccctggagtcacatgggtggtggagtcagcaagaaagaccctgaggtcaagtcdaaactgggtatggtg
 102 gccaaggataccctgatgatagtagaaacccgaagtgacctggtggtggagtggtctcaagagggaacccagggtgaattttaaattggtatggtt
 201 gagggggtgaggtgcataaattgccaaagacaaatccggggaggagcagtaacaabagacgtacccgttgggtcagggctcttaccggtcgtgcabpaggaact
 202 gatgggttgaggtgcaaacgccaacacaaaccagagaggagcagtaacaattctactatagagtgggtgtctgtgctpacagtgctgcattcaggattt
 301 ggctgaattggaaggatcaaatggaaggttcaccaaaagccctccagccctdatccagaaaacccatctcaaaagccaaagggtagcccccagaacc
 302 ggctgaacggaaaagaaatacaaatgtaaaagttagcaatgaagccctgcccctccatagagaagaaatagaaaggccaagggctcagccaatggagacc
 401 acaggtgtacacccctgcccaccatccgggatgagctgacaaagaabccaggtccagctgaacctgctgggtcaaaaggtctctatcccaggadacatcccctg
 402 ccaggtgtatacactgcccaccagtagagabaaactgacaaagaatccaggtgtctctgacatgtctggtagaggttatcccatctgatatcccctg
 501 gajtgggagagaaatgggcaacgggagaaacaaactacaagaacacggctccggctggactcggagggctcctttctctctacagaaagctpacaggtgg
 502 gaattgggatactaaagccagccagccagagaaataactataagaacacacccacccagctggatggcagcttttctgtattctaaagctgacagtggtg
 601 adaaagcaggtggcagcaggggaagcttctcatgctccgtgagacagaggtctgcacaaacbaactaaabccagaaaagccttccctgtcttcgggg
 602 ataagctccgggtggcagcaggggaatgtgtttagctgttagtgcattgaggtctgcacaaatcaactataccagaaaactctctgactctgagccaggt
 701 taabaaagatcccaaatctgggtgtgggtgggtgagttggtggagttctggctgtatagcttggtagtaacatggccttatactttctgggtgag
 702 caapaaaggacccaagtctgggtctgggtgggtggaggggtgctggctgttactctctgtgtgacagggccttactatcttttgggtggc
 801 a---gagtgaacttcagcagagcagagcccccggccatadccagcagggcccaagaccactctatbaacgagctcaaatctagggacgagaggagggtacg
 802 tcccgggtgaagtttctcgtctgagatgcccagccctatcagcagggcccaagatcaactgttapaatgactgaaacttggcagacgggggagggaggtacg
 898 atgttttgabaagagagctggccggaccctggagatgggggaaagccgabaaggaagaccctcaggaagggctgtacaaatgaatcgcagaaagataa
 902 atgtgtctggatbaagcggagaggcaagaccctggagatggcggaaacacagcccaaaatcccaggaagggtactctataacagagtgcagaaagagaa
 998 gatggggaggccatacagtgagattgggagtaaaagggcagggccggagggggaaggggcagattggcccttaccaggtctcagtagagagccaaaggaac
 1002 aatggccgaggccatactccgagatgggcatgaaggagagagagagcgggaaagggccacgagggcctgtatcaggggattgtccacggctacaagaat
 1098 acttadagagcccttccatgcagggccctgctcctccggag
 1102 acatgatgcccctgacatgcagggccctgcaacc---caga

FIG. 4

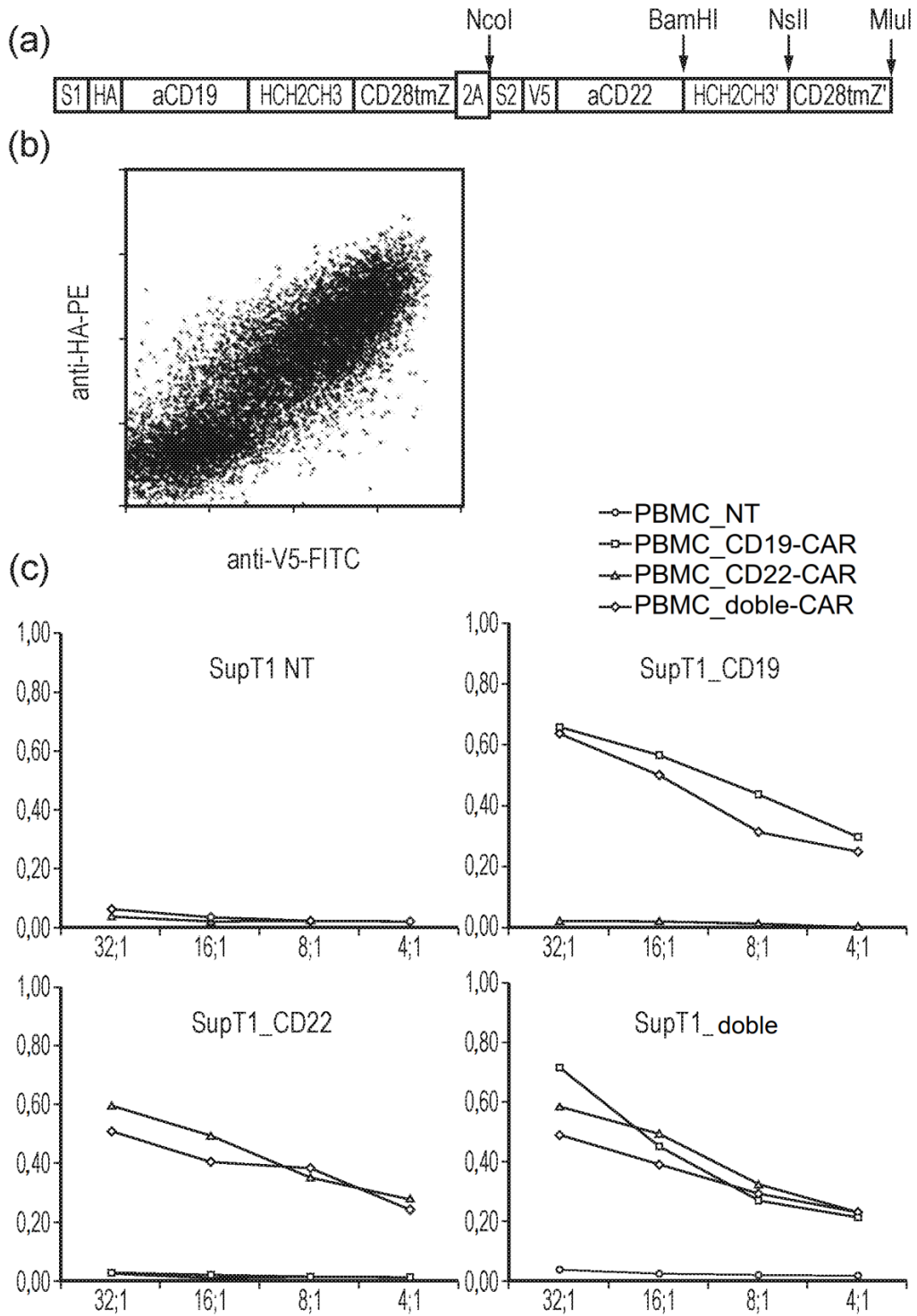


FIG. 5

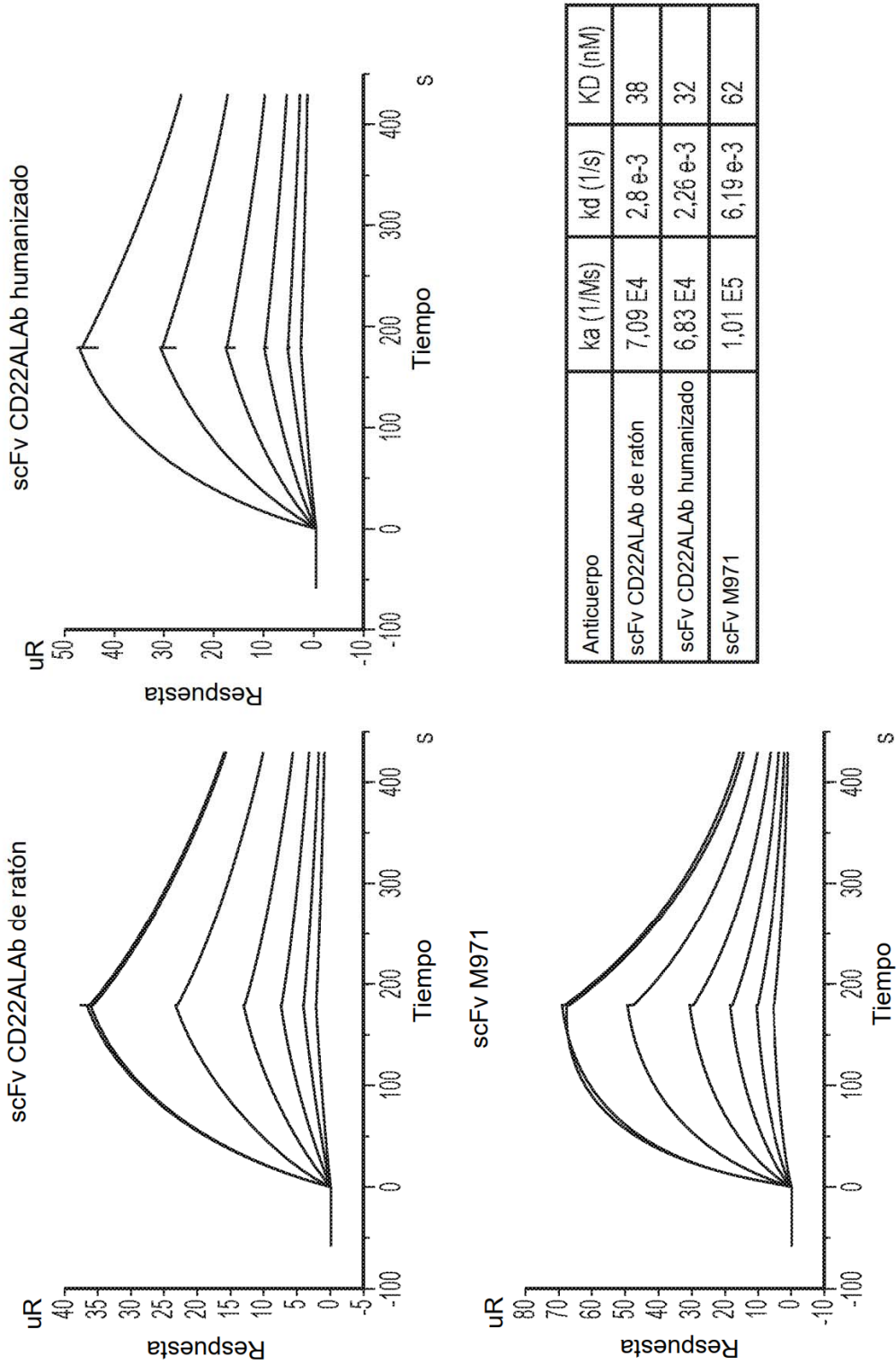


FIG. 6

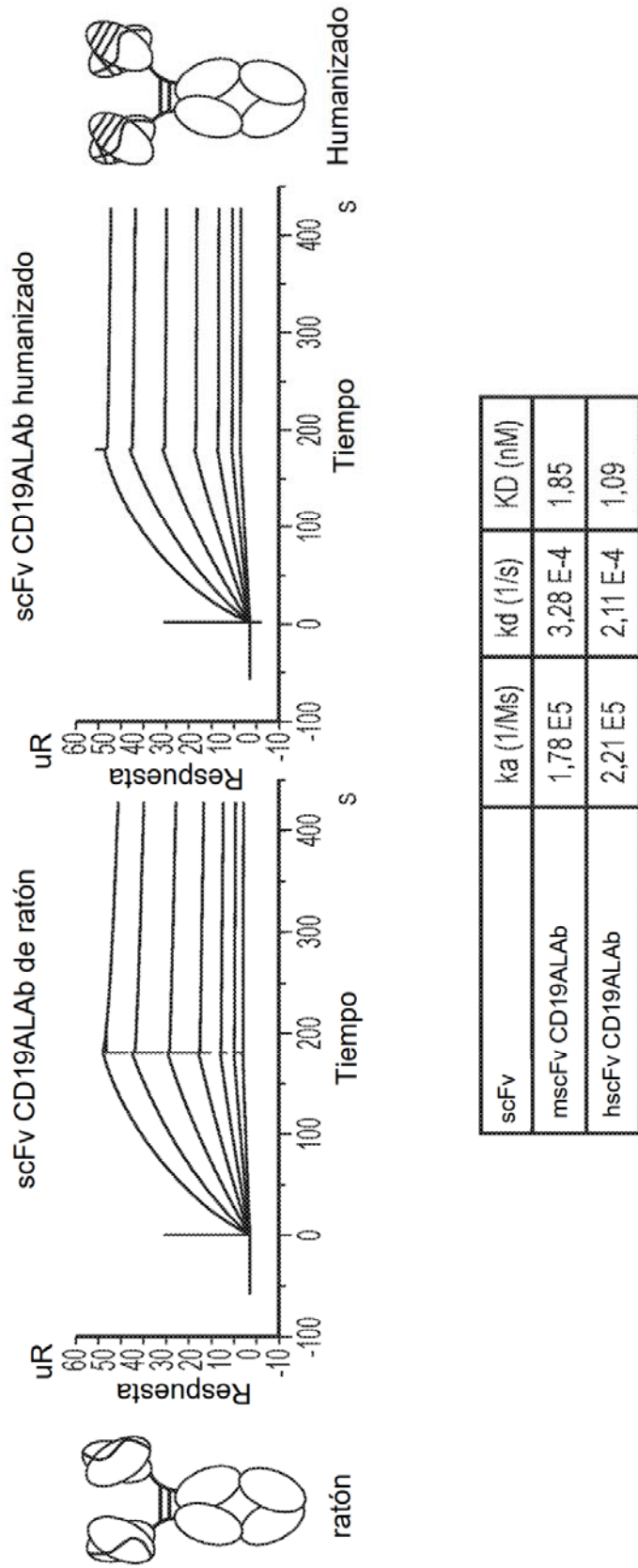


FIG. 7

| scFv | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (nM) | n |
|----------|------------------------------|---------------------------------|---------------|---|
| CD19ALAb | $1,65 \pm 0,143 \times 10^5$ | $3,00 \pm 2,198 \times 10^{-4}$ | $1,1 \pm 0,2$ | 2 |
| FMC63 | $3,2 \pm 0,8 \times 10^5$ | $3,9 \pm 1,2 \times 10^{-4}$ | $1,3 \pm 0,7$ | 2 |

FIG. 8

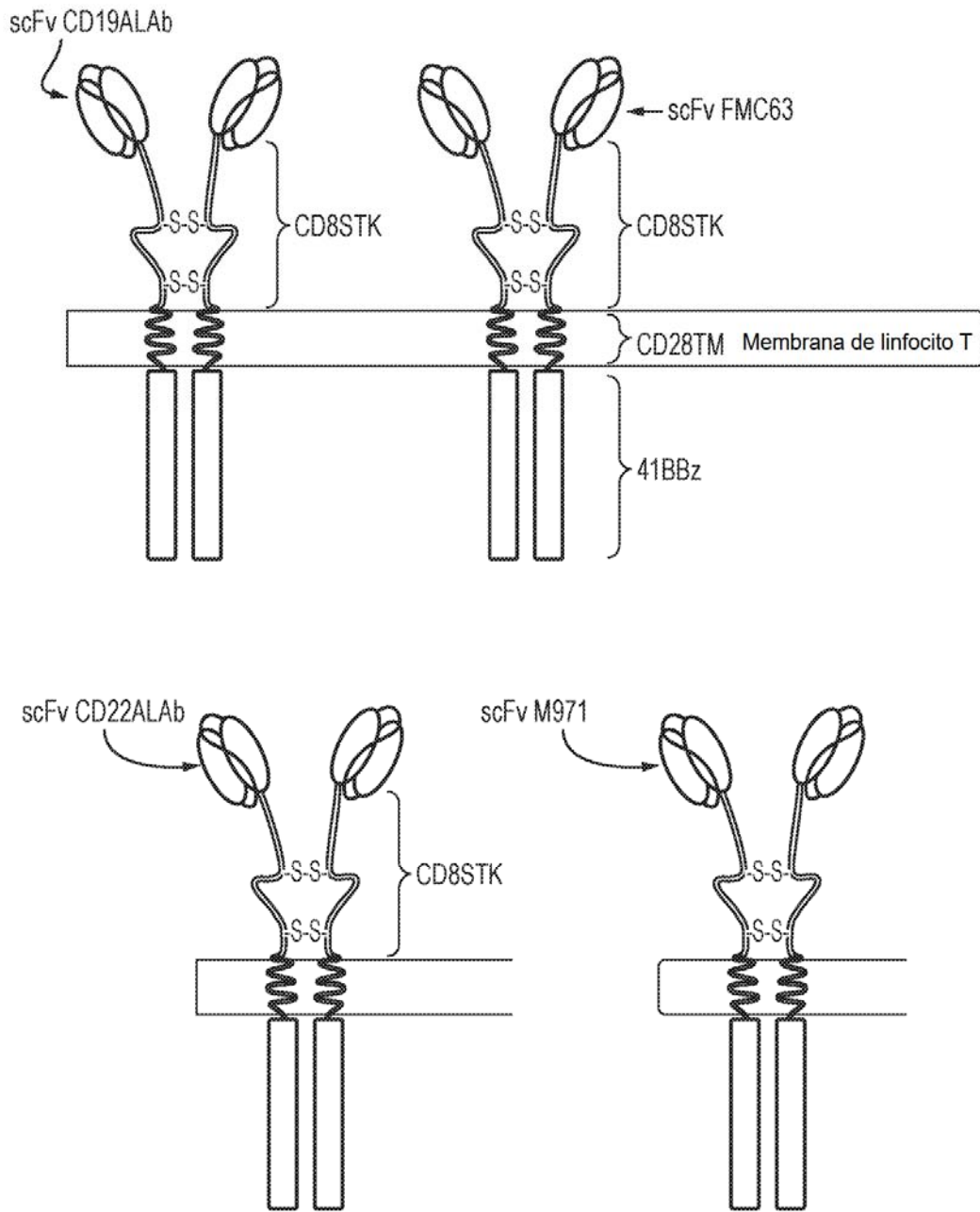


FIG. 9

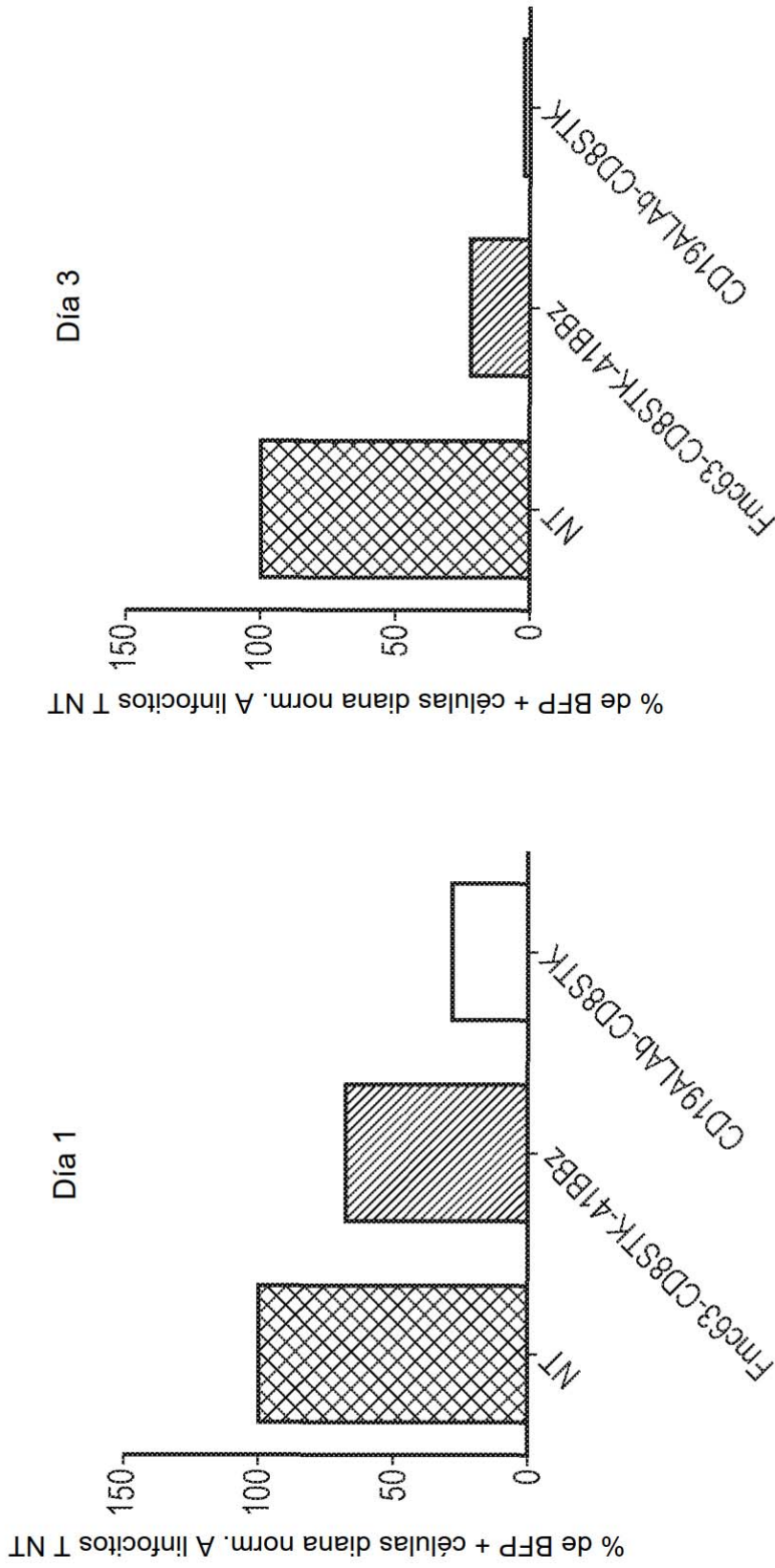


FIG. 10

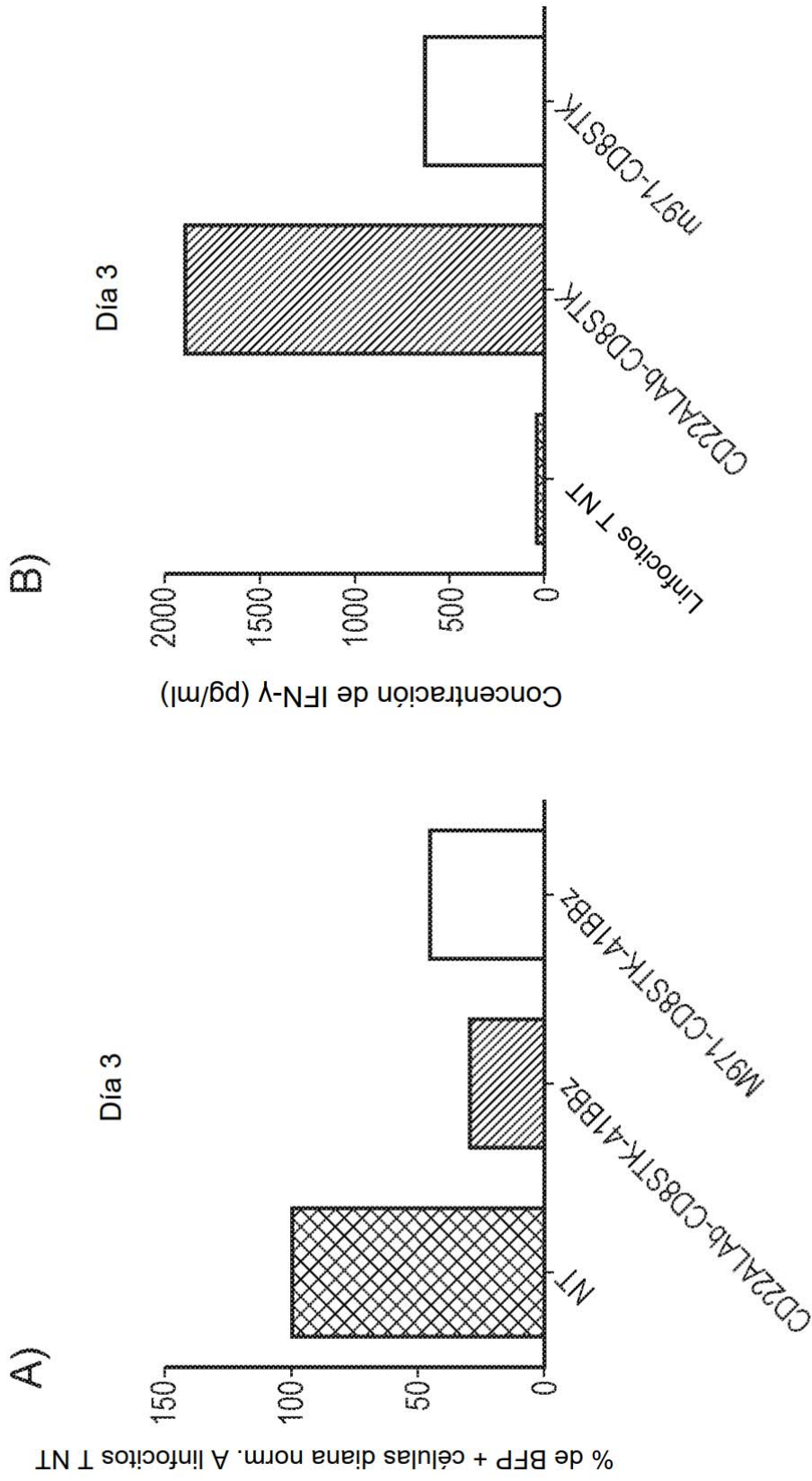


FIG. 11

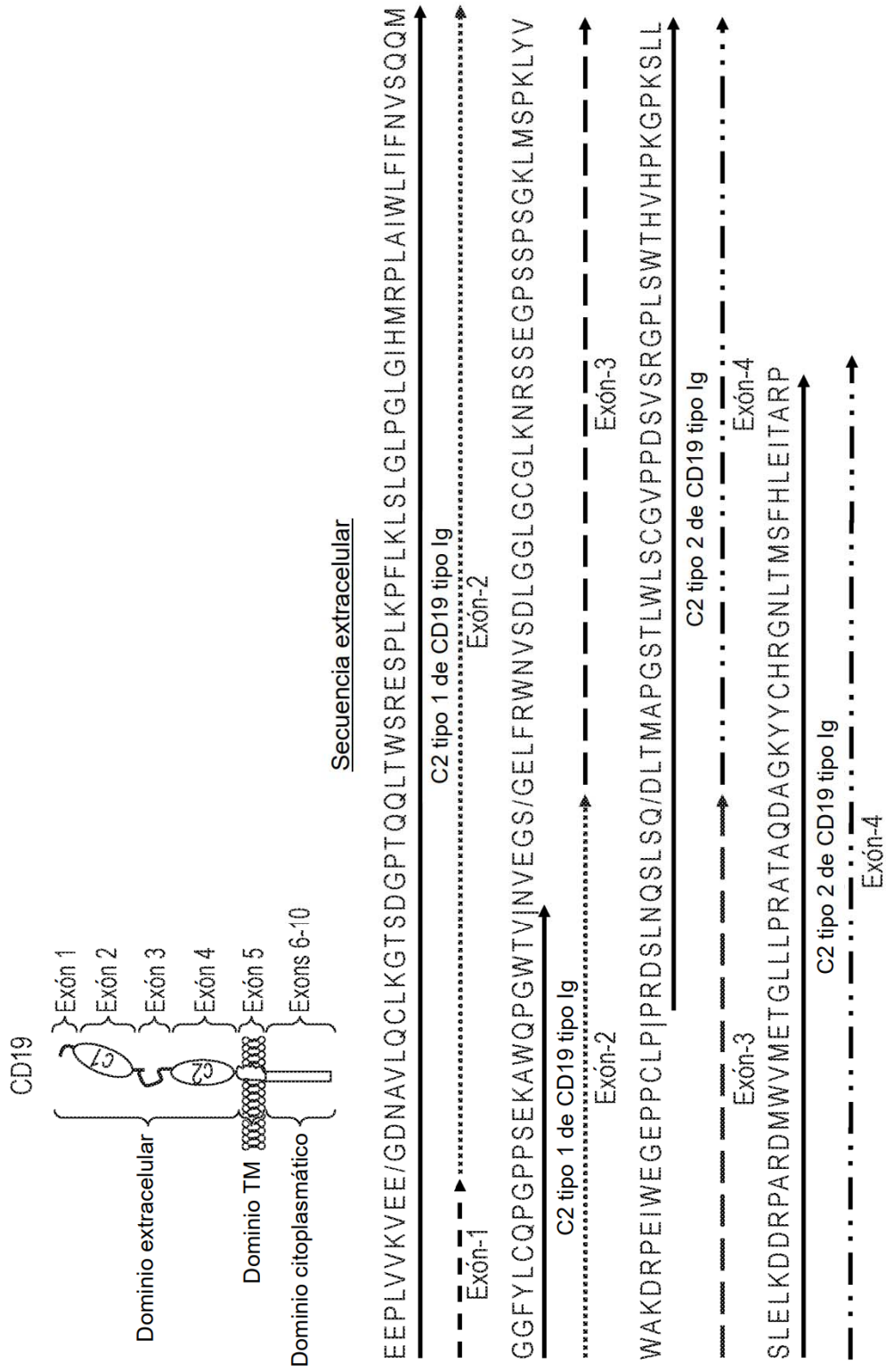


FIG. 12

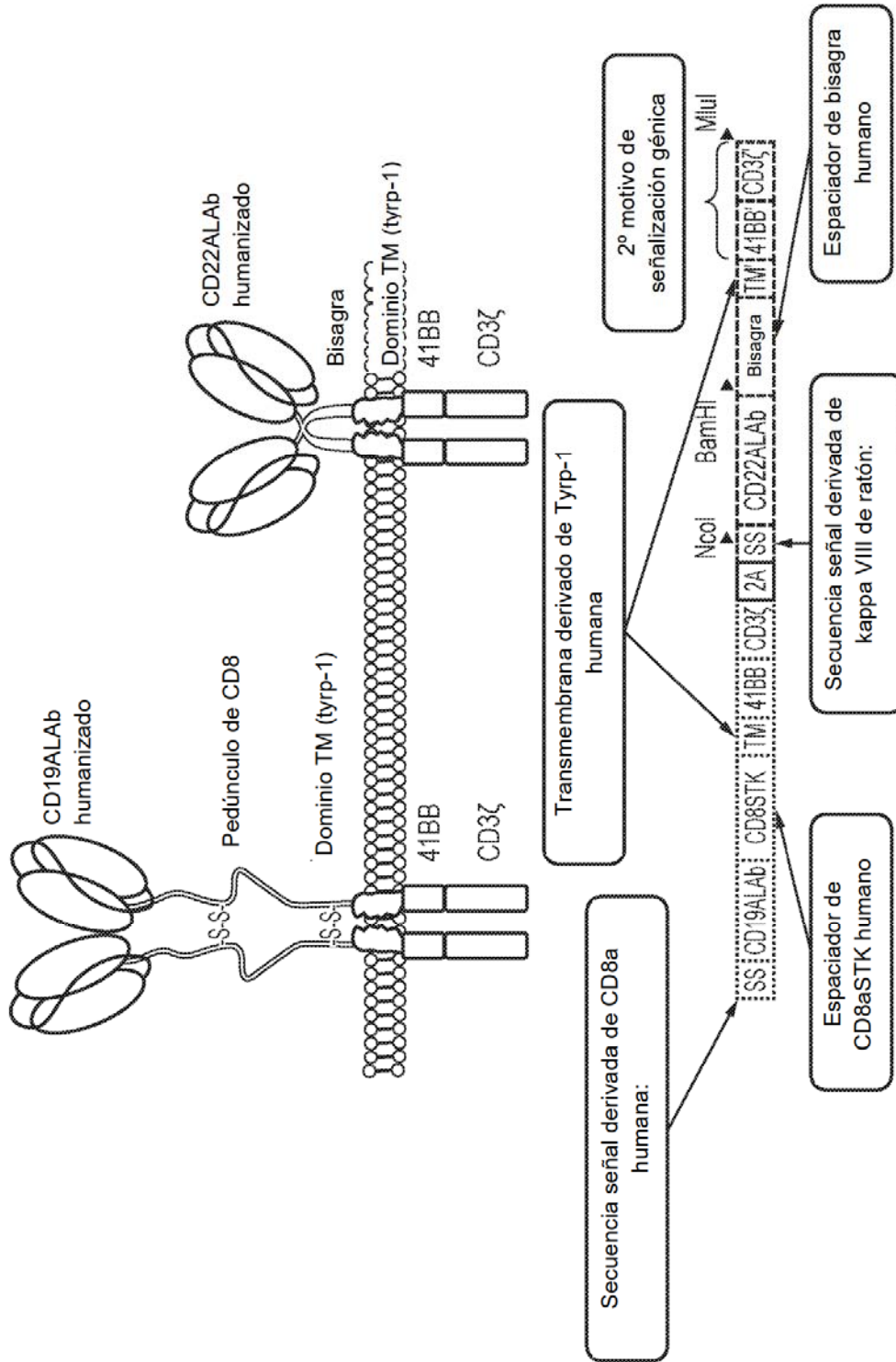


FIG. 13A

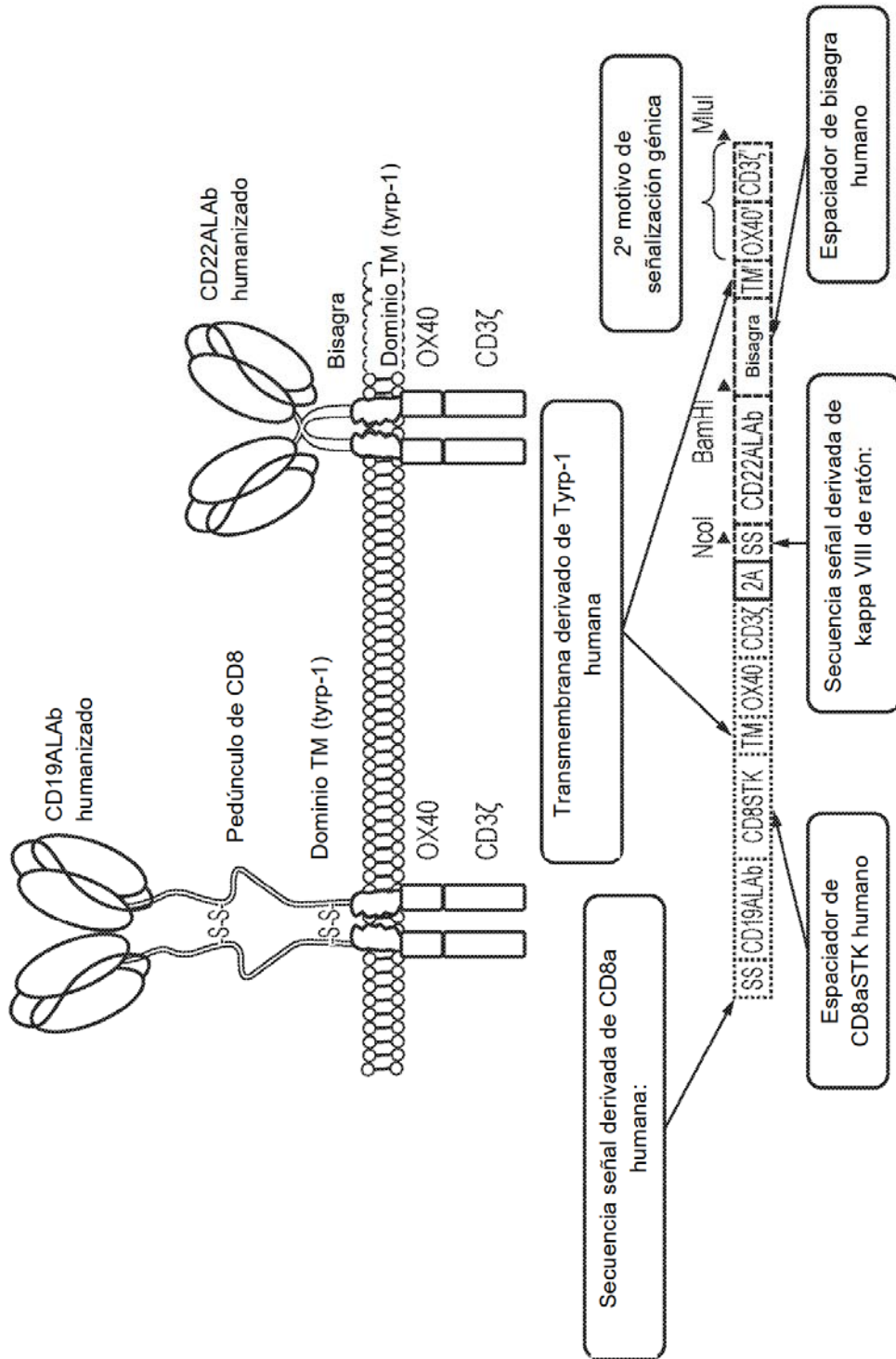


FIG. 13B

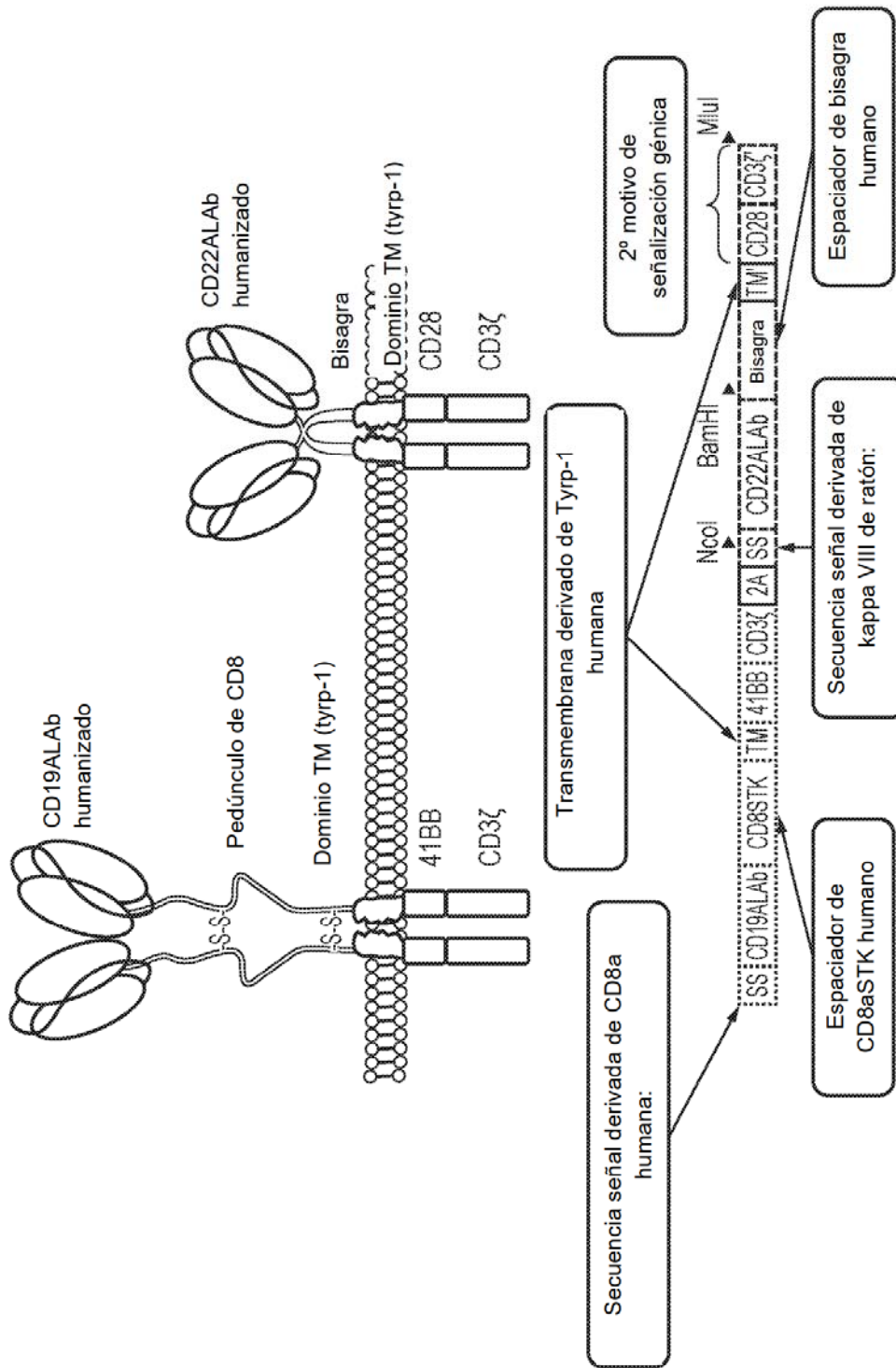


FIG. 13C

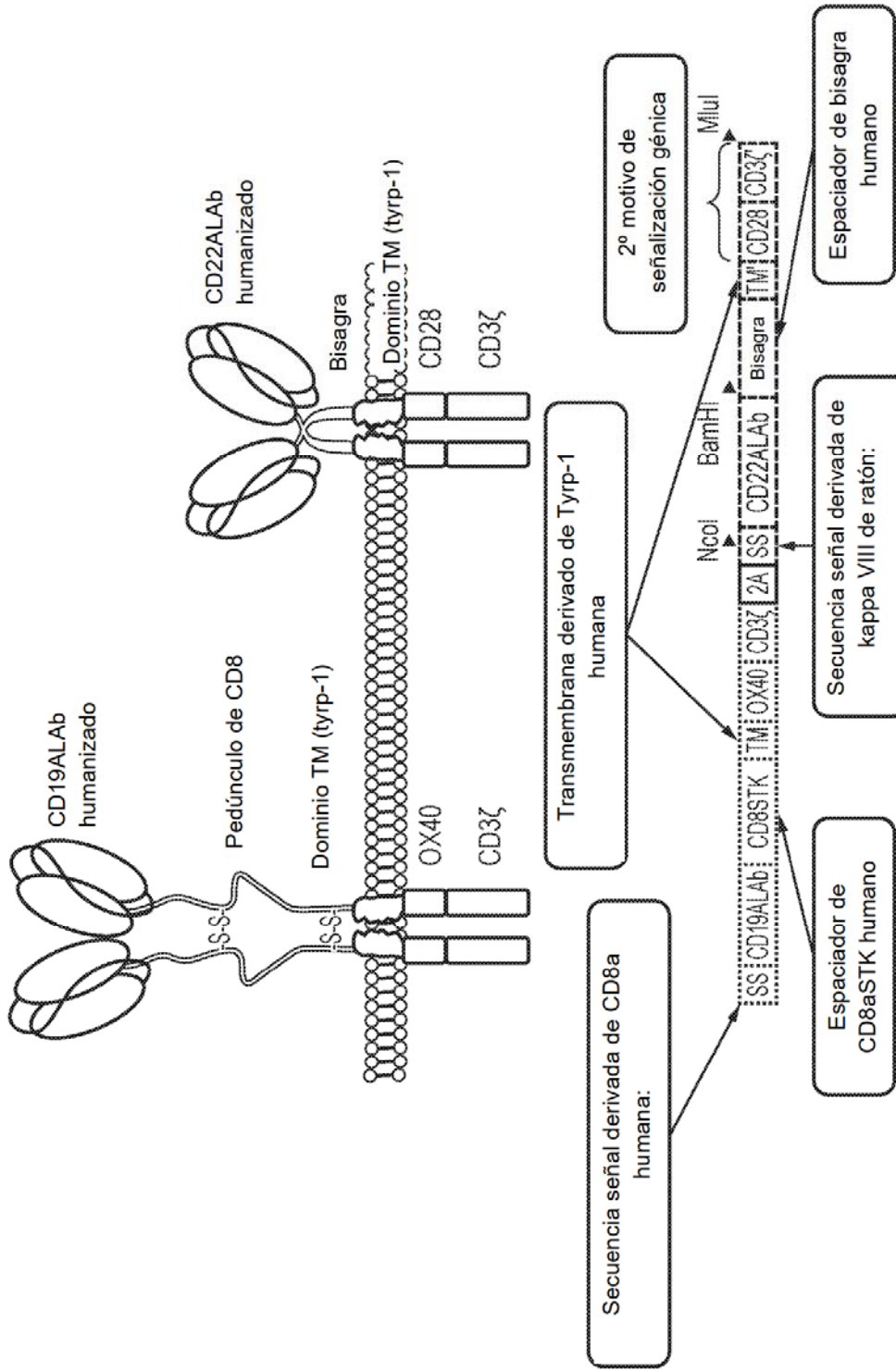


FIG. 13D

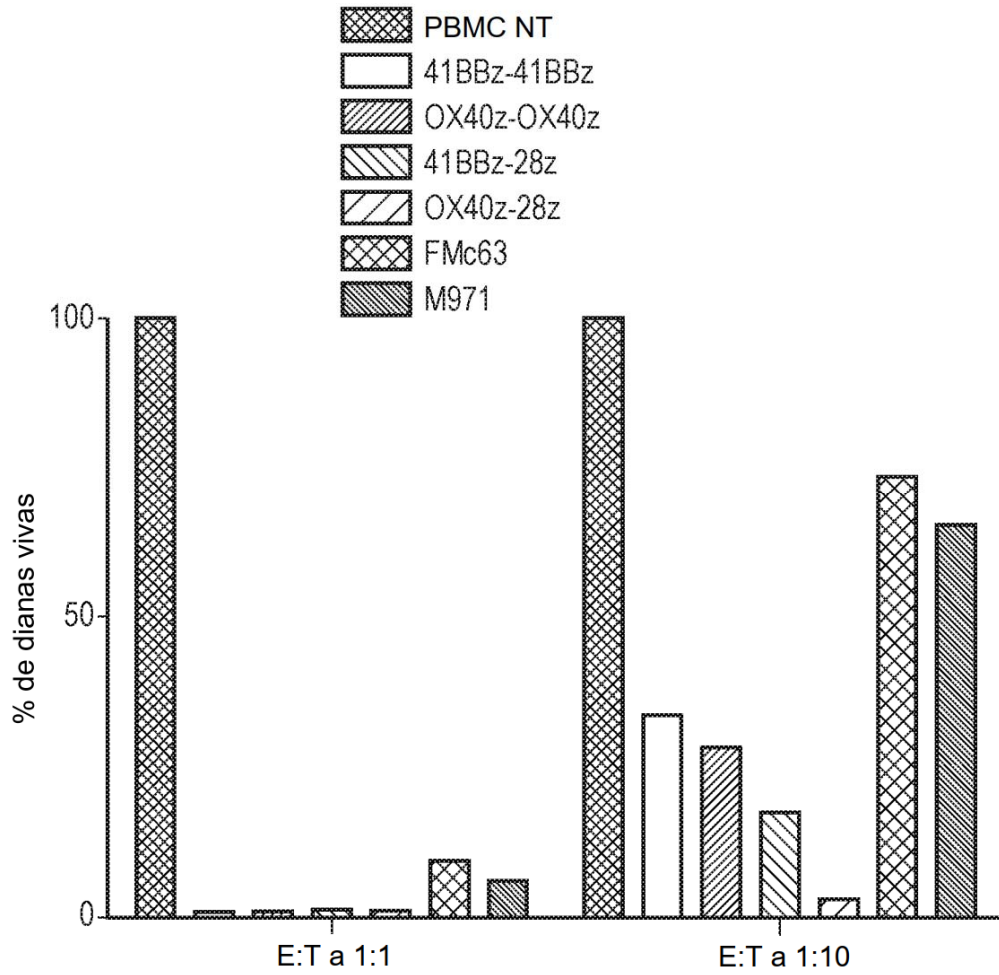


FIG. 14