

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 099**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14765454 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2968415**

54 Título: **Células T redirigidas por receptores de antígenos quiméricos específicos de CD123, y métodos de su uso**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313844048

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

10.03.2020

73 Titular/es:

**CITY OF HOPE (100.0%)
1500 East Duarte Road
Duarte, CA 91010-3000, US**

72 Inventor/es:

**FORMAN, STEPHEN y
MARDIROS, ARMEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 747 099 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

Células T redirigidas por receptores de antígenos quiméricos específicos de CD123, y métodos de su uso

INTERÉS DEL GOBIERNO

5 La presente invención se obtuvo con el apoyo del Gobierno bajo las cesiones P50 CA107399, P01 CA030206, y M01 RR0004 del NIH. El Gobierno tiene ciertos derechos en la presente invención.

ANTECEDENTES

10 La leucemia mieloide aguda (AML) es una enfermedad caracterizada por la rápida proliferación de células mieloides inmaduras en la médula ósea, que da como resultado hematopoyesis disfuncional [1]. Los tratamientos de primera línea para la leucemia mieloide aguda (AML) se han mantenido prácticamente sin cambios durante casi 50 años, y la AML sigue siendo una enfermedad de mal pronóstico. Aunque la quimioterapia de inducción estándar puede inducir remisiones completas, muchos pacientes recaen y sucumben eventualmente a la enfermedad [2]. Por lo tanto, es crucial el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para la AML.

15 El trasplante alogénico de células hematopoyéticas puede lograr la cura de la enfermedad en pacientes seleccionados, y destaca la susceptibilidad de la AML a la inmunoterapia derivada del donante. Adicionalmente, la cadena alfa del receptor de interleucina 3 (CD123) se ha identificado como una diana inmunoterapéutica potencial, puesto que se sobreexpresa en la AML en comparación con células madre hematopoyéticas normales.

20 Los recientes avances en el inmunofenotipado de las células de AML han revelado varios antígenos de superficie celular asociados a AML que pueden actuar como dianas para terapias futuras [3]. De hecho, se han descrito investigaciones pre-clínicas que usan anticuerpos dirigidos contra CD44, CD47, proteína-3 con dominio de mucina e inmunoglobulina de células T (TIM-3), y la cadena alfa del receptor de interleucina 3 (IL-3R α ; CD123) para el tratamiento de AML, y han mostrado actividad anti-leucémica prometedora en modelos murinos [3, 4]. CD123 se expresa en diversas neoplasias, incluyendo leucemia mieloide aguda y crónica, leucemia de células pilosas, leucemia linfoblástica aguda de estirpe de células B, y neoplasias de células dendríticas plasmacitoides blásticas. Adicionalmente, CD123 no se expresa típicamente en células madre hematopoyéticas normales, haciendo de esta manera a CD123 una diana inmunoterapéutica ideal. Adicionalmente, se han completado dos ensayos de fase I para sustancias terapéuticas específicas de CD123, presentando ambos fármacos buenos perfiles de seguridad (ClinicalTrials.gov ID: NCT00401739 y NCT00397579). Desafortunadamente, estos fármacos dirigidos contra CD123 tuvieron eficacia limitada, sugiriendo que se pueden requerir terapias alternativas, y más potentes, dirigidas contra CD123 para observar actividad anti-leucémica.

30 Una terapia alternativa posiblemente más potente para el tratamiento de AML es el uso de células T que expresan receptores de antígenos quiméricos (CARs) que redirigen la especificidad de las células T hacia antígenos asociados a tumores de superficie celular (TAAs) de una manera independiente de MHC [5]. En la mayoría de casos, los CARs incluyen un fragmento variable monocatenario (scFv) de un anticuerpo monoclonal fusionado al dominio de señalización de CD3 ζ , y pueden contener un endodominio co-estimulante [5]. Se han desarrollado varios grupos de CARs dirigidos contra diversos antígenos para el tratamiento de neoplasias de células B [6-10], y muchos han continuado para evaluar células T que expresan CAR en ensayos clínicos de fase I [11-15]. En contraste, las células T diseñadas de CAR para el tratamiento de AML siguen siendo escasas [16, 17].

40 Aunque los regímenes de tratamiento actuales para la AML pueden lograr respuestas completas en pacientes seleccionados, muchos recaerán eventualmente, subrayando la necesidad de nuevas sustancias terapéuticas que pueden conducir a repuestas más duraderas. Actualmente se están desarrollando diversas inmunoterapias dirigidas contra la AML, incluyendo linfocitos T citotóxicos específicos de antígenos, células exterminadoras naturales alorreactivas, y vacunas de células dendríticas. Por ejemplo, Oka y colegas han mostrado que la vacunación del péptido del Tumor 1 de Wilms puede conducir a respuestas clínicas e inmunológicas en pacientes con AML [33]. Sin embargo, estas terapias dirigidas dependen de HLA. Para este fin, sería deseable diseñar una sustancia terapéutica seleccionada, tal como un CAR, que pueda redirigir la especificidad de células T para seleccionar selectivamente células de AML de manera independiente de HLA.

50 Armen Mardiros et al. describen en Blood, vol. 120, no. 21, no. 21 (2012-11-16 a 2012-12-11), en la página 950, que células T redirigidas por receptores de antígenos quiméricos específicos de CD123 exhiben una potente actividad citolítica y múltiples funciones efectoras frente a leucemia mieloide aguda sin alterar la formación de colonias hematopoyéticas normal in vitro.

Thokala Radhika et al. describen en BLOOD, vol. 118, no. 21 (2011-11-18 a 2011-12-13, en la página 1908, una dianización de leucemias mediante un receptor de antígenos quiméricos específicos de CD123.

SUMARIO

55 La presente invención se define mediante la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención.

Se desarrolló una familia de receptores de antígenos quiméricos (CARs) que contienen un scFv específico de CD123, para seleccionar como dianas a epitopos diferentes en CD123. En algunas realizaciones, tal gen del receptor de antígeno quimérico de CD123 (CD123CAR) incluye una región de scFv anti-CD123 fusionada en el marco a una región bisagra de IgG4 modificada que comprende una alteración de una región espaciadora de IgG4 que eliminaría la unión al receptor de Fc. En una realización, la región bisagra de IgG4 modificada incluye una sustitución S228P, una sustitución L235E, y una sustitución N297Q. El gen CD123CAR también incluye al menos un dominio de señalización co-estimulante, y un dominio de señalización de la cadena zeta del receptor de células T (TCR). En algunas realizaciones, el gen CD123CAR incluye una secuencia nucleotídica seleccionada de SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4. En otras realizaciones, el gen CD123CAR codifica una secuencia de aminoácidos que incluye SEQ ID NO:11, o SEQ ID NO:12.

Según las realizaciones descritas más abajo, los genes CD123CAR pueden ser parte de un casete de expresión que se inserta en un vector (por ejemplo, un vector vírico). Como tal, una población de células T humanas se puede transducir por el vector, dando por resultado la expresión de los genes CD123CAR por las células T. Cuando se expresan en células T de donantes sanos (CD4/CD8), los CD123CARs redirigen la especificidad de células T y median la potente actividad efectora contra líneas de células CD123+ así como muestras de pacientes con AML primarias. Las células T de CD123CAR no alteran significativamente la formación de colonias de granulocitos/macrófagos y eritroides *in vitro*, sugiriendo un efecto diferencial en células de AML, en oposición a las células inmunes.

Además, las células T obtenidas de pacientes con AML activa se pueden modificar para que expresen genes CD123CAR y sean capaces de lisar los blastos de AML autólogos *in vitro*. Estos resultados sugieren que las células T transducidas con CD123CAR se pueden usar como una inmunoterapia para el tratamiento de AML de alto riesgo. De esta manera, según algunas realizaciones, se proporcionan composiciones para uso en métodos para tratar AML en un sujeto, en el que tales métodos incluyen una etapa de administrar una primera población de células T transducidas con un primer gen CD123CAR al sujeto. Los métodos pueden comprender además una etapa adicional de administrar al sujeto la primera población de células T transfectadas con el primer gen CD123CAR en combinación con una segunda población de células T transducidas con un segundo gen CD123CAR. En algunas realizaciones, el primer gen CD123CAR incluye una secuencia nucleotídica seleccionada de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4. El segundo gen CD123CAR también puede incluir una secuencia nucleotídica seleccionada de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4; sin embargo, la secuencia nucleotídica del segundo gen CD123CAR puede no ser la misma que la seleccionada para el primer gen CD123CAR. Esto da como resultado un tratamiento de combinación de AML usando dos o más poblaciones diferentes de células T transducidas con CD123CAR, que pueden provocar un efecto sinérgico cuando se comparan con el uso de una única población de células T transducidas con CD123CAR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra que los CARs específicos de CD123 se pueden expresar en células T humanas de donantes sanos. (A) Diagrama esquemático del CAR que contiene una bisagra de IgG4 modificada, un dominio transmembránico y de señalización intracelular modificado de CD28, y el dominio de señalización de CD3 ζ . También se indican la secuencia de omisión ribosómica T2A y el marcador de transducción de EGFR truncado (EGFRt). (B) Fenotipo representativo de células T transducidas simuladamente y lentitransducidas derivadas de un único donante sano. Tras la selección inmunomagnética y un ciclo de expansión, las células T modificadas con CAR se tiñeron con anticuerpo anti-Fc biotinilado o anticuerpo anti-EGFR biotinilado, seguido de estreptavidina conjugada con PE y anti-TCR α/β , anti-CD4, o anti-CD8, y se analizaron mediante citometría de flujo. La colocación del cuadrante se basa en la tinción con controles isotípicos, y se indica el porcentaje de células que caen en cada cuadrante. (C) Expresión de marcadores de superficie celular indicados procedentes de tres estirpes de células T de donantes sanos diferentes tras la selección inmunomagnética y un ciclo de expansión. Los datos representan valores medios \pm SEM.

La Figura 2 muestra que células T que expresan CAR específicos de CD123 lisan estirpes celulares tumorales que expresan CD123. (A) Análisis quilométrico de flujo de células 293T transfectadas transitoriamente para expresar CD123 (parte superior, línea negra) o CD19 (parte inferior, línea negra). Células 293T progenitoras transducidas simuladamente se tiñeron con anticuerpos anti-CD123 o anti-CD19 (relleno en gris, parte superior e inferior) para determinar los niveles de expresión del fondo. (B) Citotoxicidad específica de células T que expresan CD123-CAR (26292 y 32716) frente a células 293T que expresan CD123 (293T-CD123) o CD19 (293T-CD19) mediante ensayo de liberación de cromo. Los datos representan valores medios de pocillos por triplicado \pm S.D. (C) Análisis quilométrico de flujo de CD123 en la estirpe celular de AML KG1a, la estirpe celular de LCL transformada con EBV, y la estirpe celular de CML K562. En cada histograma se indica el porcentaje de células positivas para la tinción de CD123 (línea negra) con respecto a los controles de isotipo (relleno en gris). (D) Citotoxicidad específica de células T que expresan CD123-CAR (26292 y 32716) frente a la estirpe celular de LCL CD19+ CD123+ y la estirpe celular CD19- CD123+ KG1a mediante el ensayo de liberación de cromo. Como estirpes celulares de control positivo y negativo, se usaron respectivamente las estirpes celulares de LCL que expresa OKT3 (LCL-OKT3) y la K562 CD19- CD123-. Los datos representan valores medios de pocillos por triplicado + S.D.

La Figura 3 muestra que células T específicas de CD123 liberan INF- γ y TNF- α , y proliferan en respuesta a

células diana que expresan CD123. Células T que expresan CD123-CAR, o células T equivalentes de control, procedentes de tres donantes sanos, se cocultivaron con las estirpes celulares indicadas durante 24 horas en una E:T de 10:1, y la liberación de IFN- γ y TNF- α se cuantificó mediante tecnología de perlas multiplex Luminex. (B) Células T específicas de CD19 o de CD123 marcadas con CFSE con pares coincidentes se cocultivaron con las estirpes celulares estimulantes indicadas durante 96 horas a una E:T de 2:1, y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la dilución de CFSE. Como controles de proliferación de células T de línea base, se usaron células T sin estimular (histogramas llenos).

La Figura 4 muestra la activación de múltiples funciones efectoras de CD4 y CD8 por los CARs específicos de CD123 tras el cocultivo con muestras de AML primarias. Células T modificadas mediante CAR con pares coincidentes se cocultivaron durante seis horas con tres muestras de pacientes con AML primarias diferentes (AML 179, 373, y 605), y se analizaron para determinar la expresión de CD107a en la superficie y la producción intracelular de IFN- γ o TNF- α . (A, gráficas de barras) Porcentaje de células DAPI-CD3+CD8+ EGFRt+ que expresan CD107a. Los datos representan valores medios \pm S.D. (A, gráficas circulares). Las fracciones de células CD3+CD8+ EGFRt+ que sufren desgranulación y que producen IFN- γ y/o TNF- α se representan gráficamente en las gráficas circulares. (B) Datos de la población de DAPI-CD3+CD4+EGFRt+ procedente del mismo experimento como se describe en A y B. (C) Células T específicas de CD19 o de CD123 marcadas con CFSE con pares coincidentes se cocultivaron con las células estimulantes indicadas durante 72 horas a un E:T de 2:1, y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la dilución de CFSE en la población DAPICD3+ EGFRt+. Las estirpes celulares LCL y K562 sirvieron como 27 controles positivos y negativos, respectivamente. Pre B-ALL 802 es una muestra de paciente primaria doblemente positiva para CD19 y CD123. La colocación del cuadrante se basa en células T sin estimular.

La Figura 5 muestra que células de AML primarias son seleccionadas específicamente como dianas por células T específicas de CD123. (A) Células T específicas de CD19 o de CD123 con pares coincidentes se cocultivaron durante 4 horas con muestras de AML primarias CD34+ marcadas con 51Cr, a una E:T de 25:1. Las estirpes celulares LCL y K562 sirven como controles positivos y negativos, respectivamente. Pre B-ALL 802 es una muestra de paciente primaria doblemente positiva para CD19 y CD123. Los datos representan valores medios de pocillos por triplicado \pm S.D. (B) Lisis específica de blastos de AML procedentes de las tres muestras de pacientes con AML primarias en (A). Los datos representan valores medios \pm SEM. *, $p < 0,05$ y **, $p < 0,0005$ usando la prueba de la t de Student no emparejada, que compara 26292 y 32716 con CD19R.

La Figura 6 muestra el efecto de células T que expresan CD123 CAR en células progenitoras normales y leucémicas in vitro. (A y B) Células sanguíneas del cordón (CB) CD34+ (n = 3) se seleccionaron inmunomagnéticamente mediante CD34, y se cocultivaron con células T con pares coincidentes específicas de CD19 o de CD123, o con medio solo (sin tratar), durante 4 horas a una E:T de 25:1. Las células se colocaron entonces en placas en cultivo progenitor de metilcelulosa semisólido durante 14-18 días, y se puntuaron para la presencia de unidad formadora de colonias de granulocitos-macrófagos (CFU-GM, A) y colonias de eritroides de unidades formadoras de ruptura (BFU-E, B). Los porcentajes se normalizan a los controles de células T específicas de CD19. Los datos representan valores medios \pm SEM para tres muestras de CB diferentes. (C) Muestras de pacientes con AML primarias CD34+ (AML 493, 519, o 545) se seleccionaron inmunomagnéticamente y se cocultivaron con células T con pares coincidentes específicas de CD19 o CD123, o con medio solo (sin tratar) durante 4 horas a una E:T de 25:1. Las células se colocaron entonces en placas en cultivo progenitor de metilcelulosa semisólido durante 14-18 días, y se puntuaron para la presencia de unidades formadoras de colonias de leucemia (CFU-L). Los porcentajes se normalizan a controles de células T específicas de CD19. Los datos representan valores medios \pm SEM para tres muestras de pacientes con AML primarias diferentes. *, $p < 0,05$ usando la prueba de la t de Student no emparejada, que compara 26292 y 32716 con CD19R. (D) Formación de colonias combinadas de CB de (A) o células de AML de (C) tratadas con constructo de CAR dirigido contra CD123 (26292 o 32716) normalizadas a CD19R. *, $p < 0,05$ usando la prueba de la t de Student no emparejada.

La Figura 7 muestra que células T redirigidas por CD123 CAR, derivadas de pacientes con AML, lisan específicamente blastos autólogos in vitro. (A) Células T procedentes de tres pacientes con AML se transdujeron con lentivirus para expresar los CARs específicos de CD19R, 26292, o 32716. Se muestran estirpes de células T de AML 722 19 días tras la transducción. (B) Expresión de CD123 en células diana usadas en ensayo de liberación de 51Cr. Se indica el porcentaje de células CD123+ y el índice de fluorescencia relativa (RFI) de cada muestra. (C) Resultados de ensayos de exterminio autólogos de 4 horas usando células T manipuladas procedentes de tres muestras de pacientes con AML como efectoras, y blastos enriquecidos con CD34 autólogos marcados con 51Cr como células diana. Los datos representan valores medios de pocillos por triplicado \pm S.D.

La Figura 8 muestra cambios en el tamaño tumoral como se muestra mediante formación de imágenes bioluminiscentes de ratones NSG que se trataron cinco días tras la inyección de la estirpe celular de AML KG1a modificada para expresar luciferasa de luciérnaga (día 5) con células T transducidas con CD123CAR (26292) que contienen las mutaciones S228P+L235E o las mutaciones S228P+L235E+N297Q.

La Figura 9 muestra un diagrama esquemático de un receptor de antígeno quimérico (CAR) que tiene una Fv monocatenaria específica del antígeno, una región bisagra, un dominio de señalización coestimulante, y un

dominio de señalización de la cadena zeta del receptor de células T, según algunas realizaciones. (Imagen procedente de Urba WJ y Longo DL N Engl J Med 2011; 365:754-757).

La Figura 10 muestra un diagrama esquemático del constructo 32716CAR que tiene una mutación L235E y una mutación S228P ("32716CAR(S228P+L235E)"), junto con la secuencia nucleotídica del constructo 32716CAR(S228P+L235E) (SEQ ID NO:1 – hebra antisentido (hebra numerada en la parte superior); SEQ ID NO:5 – hebra codificante (hebra no numerada en la parte inferior)), y la secuencia de aminoácidos del constructo 32716CAR(S228P+L235E) (SEQ ID NO:9). Las mutaciones se muestran en negrita.

La Figura 11 muestra un diagrama esquemático del constructo 26292CAR que tiene una mutación L235E y una mutación S228P ("26292CAR(S228P+L235E)"), junto con la secuencia nucleotídica del constructo 26292CAR(S228P+L235E) (SEQ ID NO:2 – hebra antisentido (hebra numerada en la parte superior); SEQ ID NO:6 - hebra codificante (hebra no numerada en la parte inferior)), y la secuencia de aminoácidos del constructo 26292CAR(S228P+L235E) (SEQ ID NO:10). Las mutaciones se muestran en negrita.

La Figura 12 muestra un diagrama esquemático del constructo 32716CAR que tiene una mutación L235E, una mutación S228P y una mutación N297Q ("32716CAR(S228P+L235E+N297Q)"), junto con la secuencia nucleotídica del constructo 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) (SEQ ID NO:3 – hebra antisentido (hebra numerada en la parte superior); SEQ ID NO:7 - hebra codificante (hebra no numerada en la parte inferior)), y la secuencia de aminoácidos del constructo 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) (SEQ ID NO:11), según algunas realizaciones. Las mutaciones se muestran resaltadas, en negrita y subrayadas. El código de bases de IUPAC R corresponde a una A o G, y el código de bases de IUPAC Y corresponde a una T o C.

La Figura 13 muestra un diagrama esquemático del constructo 26292CAR que tiene una mutación L235E, una mutación S228P y una mutación N297Q ("26292CAR(S228P+L235E+N297Q)"), junto con la secuencia nucleotídica del constructo 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) (SEQ ID NO:4 – hebra antisentido (hebra numerada en la parte superior); SEQ ID NO:8 - hebra codificante (hebra no numerada en la parte inferior)), y la secuencia de aminoácidos del constructo 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) (SEQ ID NO:12), según algunas realizaciones. Las mutaciones se muestran en negrita. El código de bases de IUPAC R corresponde a una A o G, y el código de bases de IUPAC Y corresponde a una T o C.

La Figura 14 muestra la expresión de CD123 en muestras de AML primarias y sangre del cordón umbilical. (A) Ejemplo representativo de expresión de CD123 en células de AML primarias. Las células se acotaron en la población DAPI⁺linaje⁻CD34⁺, y se evaluaron para determinar la expresión de CD123 (negro – control de isotipo, rojo – anti-CD123). (B) Porcentaje de células positivas a CD123 expresadas en la población DAPI⁺linaje⁻CD34⁺. Cada punto representa una muestra individual. (C) Índice de fluorescencia relativa (RFI) de CD123 en la población en la población DAPI⁺linaje⁻CD34⁺. El RFI se calcula dividiendo la mediana de células anti-CD123 entre la mediana de células teñidas con el control de isotipo. (D) Superposición de histogramas de la expresión de CD123 en AML 605 (rojo), AML 722 (azul), y muestra de sangre del cordón (gris). El control de isotipo se muestra en negro.

La Figura 15 ilustra una estrategia de acotamiento usada para investigar la activación de múltiples funciones efectoras por células T específicas de CD123 en respuesta a la incubación con muestras de pacientes con AML primarias. La estrategia de acotación para citometría de flujo policromática, para identificar las funciones efectoras de células T, se muestra para células T específicas de CD123 CAR (basadas en 26292) tras el cocultivo con AML 373. (A) Se establece una acotación inicial en células CD3⁺. (B) Se establece en células EGFRt⁺ una acotación secundaria, establecida usando un control de fluorescencia menos uno. (C) Se establece una acotación terciaria para poblaciones CD4⁺ y CD8⁺. (D) Se establece una acotación final en células CD107a⁺. (E) Producción de IFN- γ y TNF- α en las poblaciones CD107a⁺. Los cuadrantes se establecieron usando muestras teñidas con el control de isotipo. Se señalan los porcentajes en cada cuadrante.

La Figura 16 muestra CFSE que se diluye en las poblaciones tanto de CD4 como de CD8 de células T que expresan CAR. Se muestran aquí las subpoblaciones de CD4 (A) y CD8 (B) de las células mostradas en la Figura 5C. Tras un acotamiento inicial en células DAPI⁺CD3⁺EGFRt⁺, las células CD4 y CD8 se analizaron para determinar la dilución de CFSE tras el cocultivo con muestras de pacientes con AML primarias. La colocación del cuadrante se basa en células T sin estimular.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Ciertas realizaciones de la invención se describen con detalle, usando ejemplos específicos, secuencias, y dibujos. Las realizaciones enumeradas no están destinadas a limitar la invención a esas realizaciones, ya que la invención está destinada a cubrir todas las alternativas, modificaciones, y equivalentes, que se pueden incluir en el alcance de la presente invención como se define mediante las reivindicaciones. Un experto en la técnica reconocerá que, en la práctica de la presente invención, se podrían usar muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí.

En algunas realizaciones, se proporciona un gen que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido contra un tumor. Según ciertas realizaciones, el gen codifica un CAR específico de CD123 (CD123CAR). Un gen

CD123CAR incluye una región de Fv monocatenario (scFv) anti-CD123 y uno o más de los siguientes dominios: una región bisagra, un dominio de señalización coestimulante, un dominio de señalización intracelular, o una combinación de los mismos.

5 En algunas realizaciones, un gen CD123CAR puede incluir, pero no se limita a, una región de Fv monocatenario (scFv) anti-CD123, una región bisagra, opcionalmente, al menos un dominio de señalización coestimulante, y opcionalmente, un dominio de señalización intracelular.

En ciertas realizaciones, un gen CD123CAR puede incluir, pero no se limita a, una región de Fv monocatenario (scFv) anti-CD123, una región bisagra, al menos un dominio de señalización coestimulante, y un dominio de señalización intracelular (Figura 9).

10 La región de scFv anti-CD123 puede incluir una secuencia nucleotídica que, cuando se expresa, se puede unir a un epítipo de CD123. En algunas realizaciones, la región de scFv anti-CD123 incluye un nucleótido que codifica un dominio VH y un dominio VL de inmunotoxinas recombinantes (RITs) 26292 y 32716 [18]. Un gen CD123CAR que selecciona como diana a 26292, y un gen CD123CAR que selecciona como diana a 32716, también se denomina aquí como 26292CAR y 32716CAR, respectivamente. En ciertas realizaciones, una región de scFv anti-CD123
15 puede incluir una secuencia nucleotídica seleccionada de lo siguiente:

nucleótidos 82-814 de SEQ ID NO:3 para un 32716CAR

nucleótidos 82-792 de SEQ ID NO:4 para un 26292CAR; o

Dichas secuencias nucleotídicas codifican secuencias de aminoácidos seleccionadas de lo siguiente:

restos 23-266 de SEQ ID NO:11 cuando se usan en un 32716CAR; o

20 restos 23-259 de SEQ ID NO:12 cuando se usan en un 26292CAR.

En ciertas realizaciones, la región de scFv anti-CD123 se puede modificar para potenciar la unión o para reducir la inmunogenicidad. Por ejemplo, en un aspecto, la región de scFv anti-CD123 puede ser una región de scFv anti-CD123 humanizada.

25 La región bisagra puede incluir al menos una porción de una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) que se encuentra entre los dominios CH2-CH3. En algunas realizaciones, las regiones bisagra es una bisagra modificada. La bisagra modificada puede tener una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos que contribuyen a reducir los efectos inespecíficos de los CD123CAR, incrementando de ese modo su especificidad y eficacia. Una "modificación de aminoácido" o una "sustitución de aminoácido" o una "sustitución", como se usa aquí, significa una sustitución, inserción, y/o supresión de aminoácido en una secuencia proteica o peptídica. Una
30 "sustitución de aminoácido" o "sustitución", como se usa aquí, significa el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia peptídica o proteica progenitora, por otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución S228P se refiere a una proteína o péptido variante, en el que la serina en la posición 228 se sustituye por prolina.

35 Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer mediante mutación de manera que un codón particular en la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o péptido se cambia por un codón que codifica un aminoácido diferente. Tal mutación se obtiene generalmente haciendo los menores cambios nucleotídicos posibles. Se puede obtener una mutación de sustitución de este tipo para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de una manera no conservativa (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular por un aminoácido que pertenece a otro grupo), o de una manera
40 conservativa (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tienen un tamaño o característica particular por un aminoácido que pertenece al mismo grupo). Tal cambio conservativo conduce generalmente a menos cambio en la estructura y función de la proteína resultante.

Los siguientes son ejemplos de diversos agrupamientos de aminoácidos:

- 45 • Aminoácidos con grupos R no polares: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina
- aminoácidos con grupos R polares no cargados: glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina
- aminoácidos con grupos R polares cargados (cargados negativamente a pH 6,0): ácido aspártico, ácido glutámico
- 50 • aminoácidos básicos (cargados positivamente a pH 6,0): lisina, arginina, histidina (a pH 6,0)

Otro grupo puede ser aquellos aminoácidos con grupos fenilo: fenilalanina, triptófano, tirosina.

ES 2 747 099 T3

Otro grupo puede ser según el peso molecular (es decir, tamaño de los grupos R), como se muestra más abajo:

Glicina	75
Alanina	89
Serina	105
Prolina	115
Valina	117
Treonina	119
Cisteína	121
Leucina	131
Isoleucina	131
Asparagina	132
Ácido aspártico	133
Glutamina	146
Lisina	146
Ácido glutámico	147
Metionina	149
Histidina (a pH 6,0)	155
Fenilalanina	165
Arginina	174
Tirosina	181
Triptófano	204

- En ciertas realizaciones, la bisagra modificada deriva de una IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 que incluye uno o más restos de aminoácido sustituidos por un resto de aminoácido diferente del que está presente en una bisagra sin modificar.
- 5 El uno o más restos de aminoácido sustituidos se seleccionan de, pero no se limitan a, uno o más restos de aminoácido en las posiciones 220, 226, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 234, 237, 238, 239, 243, 247, 267, 268, 280, 290, 292, 297, 298, 299, 300, 305, 309, 218, 326, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 339, o una combinación de las mismas.
- 10 En algunas realizaciones, la bisagra modificada deriva de una IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 que incluye, pero no se limita a, una o más de las siguientes sustituciones de restos de aminoácido: C220S, C226S, S228P, C229S, P230S, E233P, V234A, L234V, L234F, L234A, L235A, L235E, G236A, G237A, P238S, S239D, F243L, P247I, S267E, H268Q, S280H, K290S, K290E, K290N, R292P, N297A, N297Q, S298A, S298G, S298D, S298V, T299A, Y300L, V305I, V309L, E318A, K326A, K326W, K326E, L328F, A330L, A330S, A331S, P331S, I332E, E333A, E333S, E333S, K334A, A339D, A339Q, P396L, o una combinación de las mismas (50).
- 15 En algunas realizaciones, la bisagra modificada deriva de una bisagra de IgG4 que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
- Pos. 219 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY
- Pos. 279 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK
- Pos. 339 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVL
- Pos. 399 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO:13)

En ciertas realizaciones, la bisagra modificada deriva de IgG4 que incluye uno o más restos de aminoácidos

sustituídos por un resto de aminoácido diferente del que está presente en una bisagra sin modificar. El uno o más restos de aminoácidos sustituidos se seleccionan de, pero no se limitan a, uno o más restos de aminoácidos en las posiciones 220, 226, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 234, 237, 238, 239, 243, 247, 267, 268, 280, 290, 292, 297, 298, 299, 300, 305, 309, 218, 326, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 339, o una combinación de los mismos.

5 En algunas realizaciones, la bisagra modificada deriva de una IgG4 que incluye, pero no se limita a, una o más de las siguientes sustituciones de restos de aminoácidos: 220S, 226S, 228P, 229S, 230S, 233P, 234A, 234V, 234F, 234A, 235A, 235E, 236A, 237A, 238S, 239D, 243L, 247I, 267E, 268Q, 280H, 290S, 290E, 290N, 292P, 297A, 297Q, 298A, 298G, 298D, 298V, 299A, 300L, 305I, 309L, 318A, 326A, 326W, 326E, 328F, 330L, 330S, 331S, 331S, 332E, 333A, 333S, 333S, 334A, 339D, 339Q, 396L, o una combinación de las mismas, en el que el aminoácido en la
10 bisagra sin modificar se sustituye por los aminoácidos identificados anteriormente en la posición indicada.

En algunas realizaciones, la bisagra de IgG4 modificada incluye, pero no se limita a, una sustitución de prolina (P) en lugar de serina (S) en la posición 228 (S228P), una sustitución de leucina (L) en lugar de ácido glutámico (E) en la posición 235 (L235E), una sustitución de asparagina (N) en lugar de glutamina (Q) en la posición 297 (N297Q). En ciertas realizaciones, una región bisagra de IgG4 modificada puede incluir una secuencia nucleotídica seleccionada de lo siguiente:
15

nucleótidos 814-1500 de SEQ ID NO:3 para un 32716CAR; o

nucleótidos 793-1479 de SEQ ID NO:4 para un 26292CAR.

Dichas secuencias nucleotídicas codifican secuencias de aminoácidos seleccionadas de lo siguiente:

restos 267-495 de SEQ ID NO:3 cuando se usan en un 32716CAR; o

20 restos 260-488 de SEQ ID NO:14 cuando se usan en un 26292CAR

En un ejemplo, la región bisagra de IgG4 modificada incluye una sustitución S228P y una sustitución L235E ("S228P+L235E") (véanse las Figuras 10 y 11). En otra realización, la región bisagra de IgG4 modificada incluye una sustitución S228P, una sustitución L235E, y una sustitución N297Q ("S228P+L235E+N297Q") (véanse las Figuras 12 y 13).

25 En algunas realizaciones, la bisagra se puede modificar para sustituir la región espaciadora de Fc en el C123CAR por un espaciador que no tenga unión de Fc, tal como la región bisagra de CD8a. Como alternativa, la región espaciadora de Fc de la bisagra se puede suprimir. Tales sustituciones reducirían o eliminarían la unión de Fc.

El término "posición", como se usa aquí, es una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones se pueden numerar secuencialmente, o según un formato establecido, por ejemplo una posición de Kabat o una
30 posición EU o índice EU como en Kabat. Para todas las posiciones explicadas aquí, la numeración es según el índice EU o esquema de numeración EU (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). El índice EU o índice EU como en Kabat, o esquema de numeración EU, se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85). Las posiciones de Kabat, aunque también son bien conocidas en la técnica, pueden variar
35 con respecto a la posición EU para una posición dada. Por ejemplo, las sustituciones S228P y L235E descritas anteriormente se refieren a la posición EU. Sin embargo, estas sustituciones también pueden corresponder a las posiciones de Kabat 241 (S241P) y 248 (L248E) [21].

El dominio de señalización coestimulante puede incluir cualquier dominio coestimulante adecuado que incluya, pero no se limite a, un dominio coestimulante 4-1BB, un dominio coestimulante OX-40, un dominio coestimulante CD27, o
40 un dominio coestimulante CD28. Según las realizaciones descritas aquí, un CD123CAR puede incluir al menos un dominio de señalización coestimulante. En un aspecto, el CD123CAR tiene un único dominio de señalización coestimulante, o puede incluir dos o más dominios de señalización coestimulantes, tales como los descritos anteriormente. En otro aspecto, el dominio coestimulante puede estar formado por un único dominio coestimulante, tal como los descritos anteriormente, o como alternativa, puede estar formado por dos o más porciones de dos o
45 más dominios coestimulantes. Como alternativa, en algunas realizaciones, el CD123CAR no incluye un dominio de señalización coestimulante.

En una realización, el CD123CAR incluye un dominio de señalización coestimulante que es un dominio coestimulante CD28. El dominio de señalización CD28 puede incluir un dominio transmembránico CD28 modificado. En una realización, tal dominio transmembránico CD28 modificado tiene una o más sustituciones o modificaciones
50 de aminoácidos, que incluyen, pero no se limitan a, una sustitución de leucina-leucina (LL) por glicina-glicina (GG) en los restos de aminoácidos 530-531 de SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12; o los restos 523-524 de SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:13 (por ejemplo, RLLH → RGGH [22]). En ciertas realizaciones, una región modificada de dominio de señalización coestimulante puede incluir una secuencia nucleotídica seleccionada de lo siguiente:

nucleótidos 1501-1707 de SEQ ID NO:3 para un 32716CAR; o

nucleótidos 1480-1686 de SEQ ID NO:4 para un 26292CAR.

Dichas secuencias nucleotídicas codifican secuencias de aminoácidos seleccionadas de lo siguiente:

restos 498-564 de SEQ ID NO:3 cuando se usan en un 32716CAR; o

restos 489-557 de SEQ ID NO:4 cuando se usan en un 26292CAR.

- 5 El dominio de señalización intracelular puede incluir cualquier complejo del receptor de células T (TCR) adecuado, porción de dominio de señalización del mismo. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular es un dominio de señalización de la cadena zeta (cadena ζ) de TCR. En ciertas realizaciones, un dominio de señalización de la cadena ζ puede incluir una secuencia nucleotídica seleccionada de lo siguiente:

nucleótidos 1717-2052 de SEQ ID NO:3 para un 32716CAR; o

- 10 nucleótidos 1696-2031 de SEQ ID NO:4 para un 26292CAR.

Dichas secuencias nucleotídicas codifican secuencias de aminoácidos seleccionadas de lo siguiente:

restos 568-679 de SEQ ID NO:3 cuando se usan en un 32716CAR;

restos 561-672 de SEQ ID NO:4 cuando se usan en un 26292CAR.

- 15 Por lo tanto, según las realizaciones descritas anteriormente, el gen CD123CAR puede incluir una secuencia nucleotídica seleccionada de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4. En otras realizaciones, el gen CD123CAR puede codificar una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12. (Figuras 10, 11, 12, 13).

Expresión de genes CD123CAR y transducción de células T

- 20 En algunas realizaciones, el gen CD123CAR es parte de un casete de expresión. En algunas realizaciones, el casete de expresión también puede incluir – además del gen CD123CAR – un gen accesorio. Cuando se expresa mediante una célula T, el gen accesorio puede servir como un marcador de selección de células T transducidas, un marcador de rastreo in vivo, o un gen suicida para células T transducidas.

- 25 En algunas realizaciones, el gen accesorio es un gen de EGFR truncado (EGFRt). Un EGFRt se puede usar como una herramienta de selección no inmunogénica (por ejemplo, selección inmunomagnética que usa cetuximab biotinilado en combinación con microperlas anti-biotina para el enriquecimiento de células T que se han transducido lentivíricamente con constructos que contienen EGFRt), como un marcador de rastreo (por ejemplo, análisis citométrico de flujo para rastrear el injerto de células T), y como gen suicida (por ejemplo, vía rutas de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) mediada por Cetuximab/Erbitux®). Un ejemplo de un gen de EGFR truncado (EGFRt) que se puede usar según las realizaciones descritas aquí se describe en la Solicitud Internacional nº PCT/US2010/055329. En otras realizaciones, el gen accesorio es un gen de CD19 truncado (CD19t).

- 30 En otra realización, el gen accesorio es un gen suicida inducible. Un gen suicida es un gen recombinante que hará que la célula en la que se expresa el gen sufra la muerte celular programada o el aclaramiento mediado por anticuerpo en el momento deseado. En una realización, un gen suicida inducible que se puede usar como un gen accesorio es un gen de caspasa 9 inducible (véase Straathof et al. (2005) An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. Blood. June 1; 105(11): 4247-4254).

- 35 En algunas realizaciones, el casete de expresión que incluye un gen CD123CAR descrito anteriormente se puede insertar en un vector para el suministro – vía transducción o transfección – de una célula diana. Se puede usar cualquier vector adecuado, por ejemplo un vector bacteriano, un vector vírico, o un plásmido. En algunas realizaciones, el vector es un vector vírico seleccionado de un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector poxvírico, un vector adenovírico, o un vector vírico adenoasociado. En algunas realizaciones, el vector puede transducir una población de células T sanas. Las células diana transducidas o transfectadas con éxito expresan el uno o más genes que son parte del casete de expresión.

- 45 Como tal, una o más poblaciones de células T se pueden transducir con un gen CD123CAR. En algunas realizaciones, el gen CD123CAR incluye una secuencia nucleotídica seleccionada de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En consecuencia, en algunas realizaciones, las células T transducidas expresan un gen CD123CAR que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12. (Figuras 10, 11, 12, 13). Las células T transducidas pueden ser de un donante, o pueden ser de un sujeto que tiene AML y que necesita tratamiento para AML. En algunas realizaciones, las células T transducidas se usan en tratamiento de inmunoterapia adoptiva, para el tratamiento de AML.

- 50 Además, la una o más poblaciones de células T puede ser parte de una composición farmacéuticamente aceptable para el suministro para la administración a un sujeto. Además de las células T transducidas con CD123CAR, la composición farmacéuticamente eficaz puede incluir uno o más portadores farmacéuticamente eficaces. Un “portador farmacéuticamente aceptable”, como se usa aquí, se refiere a un material, composición o vehículo

farmacéuticamente aceptable que está implicado en portar o transportar un tratamiento de interés desde un tejido, órgano, o porción del cuerpo a otro tejido, órgano, o porción del cuerpo. Tal portador puede comprender, por ejemplo, una carga líquida, sólida, o semisólida, disolvente, tensioactivo, diluyente, excipiente, adyuvante, aglutinante, amortiguador, auxiliar de la disolución, disolvente, material de encapsulamiento, agente secuestrante, agente dispersante, conservante, lubricante, disgregante, espesante, emulsionante, agente antimicrobiano, antioxidante, agente estabilizante, agente colorante, o alguna combinación de los mismos.

Cada componente del portador es "farmacéuticamente aceptable", por cuanto debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición, y debe ser adecuado para el contacto con cualquier tejido, órgano, o porción del cuerpo que pueda encontrar, queriendo decir que no puede presentar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad, o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) polímeros naturales tales como gelatina, colágeno, fibrina, fibrinógeno, laminina, decorina, hialuronano, alginato y quitosano; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tal como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como carbonato de trimetileno, oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico (o alginato); (16) agua libre de pirógenos; (17) disolución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol, tal como alcohol etílico y propanol; (20) disoluciones amortiguadoras de fosfato; (21) termoplásticos, tales como poliácido láctico, poliácido glicólico, (22) poliésteres, tal como policaprolactona; (23) péptidos que se autoensamblan; y (24) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas, tal como acetona.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes que ajustan y amortiguan el pH, agentes que ajustan la toxicidad, y similares, por ejemplo acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, y similares.

En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable es un portador acuoso, por ejemplo disolución salina amortiguada, y similar. En ciertas realizaciones, el portador farmacéuticamente aceptable es un disolvente polar, por ejemplo acetona y alcohol.

La concentración de células T transducidas con CD123CAR en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente en base a los volúmenes de fluido, viscosidades, tamaño del órgano, peso corporal, y similar, según el modo particular de administración seleccionado, y las necesidades del sistema biológico.

En ciertas realizaciones, las poblaciones de células T transducidas con un gen CD124CAR (es decir, células T transducidas con CD124CAR), tales como aquellas células descritas aquí usadas en los métodos para seleccionar y exterminar células de AML, se pueden hacer crecer en un cultivo celular. En ciertos aspectos de esta realización, el método se puede usar en un marco *in vitro* o de investigación, para investigar el papel de CD123 en la etiología de AML, o para evaluar las capacidades dianizadoras de nuevos constructos de CD123CAR.

Tratamiento de AML con células T transducidas con CD123CAR

Según algunos ejemplos, los genes CD123CAR y las poblaciones de células T que se transducen con genes CD123CAR, tales como las descritas anteriormente, se pueden usar en composiciones para uso en métodos para tratar AML en un sujeto. Tales métodos pueden incluir una etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una población de células T transducidas con al menos un gen CD123CAR. En estas realizaciones, la población de células T transducidas con CD123CAR expresa uno o más genes CD123CAR, tales como los descritos anteriormente. En ciertas realizaciones, las células T se transducen con y expresan un constructo génico 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) (Figura 12) o un constructo génico 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) (Figura 13). Cuando tales células se administran vía un tratamiento de inmunoterapia adoptiva, las células T transducidas seleccionan específicamente como diana y lisan células que expresan CD123 (es decir, células de AML) *in vivo*, suministrando de ese modo su efecto terapéutico de eliminar células cancerosas. Como se describe en los Ejemplos más abajo, los constructos del gen CD123CAR que tienen las mutaciones S228P y L235E en el intervalo de la bisagra proporcionan protección suficiente frente a efectos inespecíficos para generar una respuesta suficiente en células cultivadas *in vitro*. Sin embargo, este dato no se debería extrapolar a estos efectos de los constructos *in vivo*. Los investigadores dan a menudo una gran diferencia a datos *in vitro* con respecto a su transferibilidad de un efecto de tratamiento a datos *in vivo*. Algunas veces, los datos *in vitro* no coinciden con los datos *in vivo*. Sin embargo, esta correlación es impredecible, debido a que, como muestra la Figura 8, los constructos génicos CD123CAR(S228P+L235E) (Figuras 10-11), que mostraron un efecto celular antitumoral muy eficaz *in vitro*, no tuvieron los mismos efectos *in vivo*. En consecuencia, se llevó a cabo una mutación adicional en la región bisagra (N297Q) para generar los constructos CD123CAR(S228P+L235E+N297Q).

En contraste con los constructos génicos CD123CAR(S228P+L235E), la administración de estos constructos dio como resultado una reducción significativa de la carga leucémica.

La población o poblaciones de células T transducidas con el gen o genes CD123CAR que se pueden usar según los métodos descritos aquí se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada de administración, solos o como parte de una composición farmacéutica. Una vía de administración se puede referir a cualquier ruta de administración conocida en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, intracraneal, parenteral, o transdérmica. "Parenteral" se refiere a una vía de administración que está generalmente asociada con inyección, incluyendo infraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardíaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intratumoral, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal, o transtraqueal. En ciertas realizaciones, las células T transducidas se administran intravenosa o intratecalmente.

La expresión "cantidad eficaz", como se usa aquí, se refiere a una cantidad de un agente, compuesto, tratamiento o terapia que produce un efecto deseado. Por ejemplo, una población de células se puede poner en contacto con una cantidad eficaz de un agente, compuesto, tratamiento o terapia para estudiar su efecto in vitro (por ejemplo, cultivo celular) o para producir un efecto terapéutico deseado ex vivo o in vitro. Una cantidad eficaz de un agente, compuesto, tratamiento o terapia se puede usar para producir un efecto terapéutico en un sujeto, tal como prevenir o tratar una afección diana, aliviar los síntomas asociados con la afección, o producir un efecto fisiológico deseado. En tal caso, la cantidad eficaz de un compuesto es una "cantidad terapéuticamente eficaz", "concentración terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz". La cantidad eficaz precisa o cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de la composición que producirá los resultados más eficaces en términos de eficacia de tratamiento en un sujeto dado o población de células. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo, pero sin limitarse a, las características del compuesto (incluyendo actividad, farmacocinética, farmacodinámica, y biodisponibilidad), el estado fisiológico del sujeto (incluyendo edad, sexo, tipo de enfermedad y etapa, condición física general, respuesta a una dosis dada, y tipo de medicación) o células, la naturaleza del portador o portadores farmacéuticamente aceptables en la formulación, y la vía de administración. Además, una cantidad eficaz o terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo de si el compuesto se administra solo o en combinación con otro compuesto, fármaco, terapia u otro método o modalidad terapéutica. El experto en las técnicas clínicas y farmacológicas será capaz de determinar una cantidad eficaz o cantidad terapéuticamente eficaz a través de la experimentación habitual, a saber, monitorizando una respuesta de las células o del sujeto a la administración de un compuesto, y ajustando la dosis en consecuencia. Para una guía adicional, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a Edición, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005. Los agentes, compuestos, tratamientos o terapias que se pueden usar en una cantidad eficaz o cantidad terapéuticamente eficaz para producir un efecto deseado según las realizaciones descritas aquí pueden incluir, pero no se limitan a, un gen CD123CAR, un casete de expresión que incluye un gen CD123CAR, un vector que suministra un casete de expresión que incluye un gen CD123CAR a una célula diana, tal como una célula T, y una población de células T que se transducen con un gen CD123CAR.

Los términos "tratar" o "tratamiento" de una afección se pueden referir a prevenir la afección, ralentizar el comienzo o velocidad de desarrollo de la afección, reducir el riesgo de desarrollar la afección, prevenir o retrasar el desarrollo de síntomas asociados con la afección, reducir o terminar los síntomas asociados con la afección, generar una regresión total o parcial de la afección, o alguna combinación de los mismos. El tratamiento también puede significar un tratamiento profiláctico o preventivo de una afección.

El término "sujeto", como se usa aquí, se refiere a un ser humano o animal, incluyendo todos los mamíferos, tales como primates (particularmente primates superiores), ovejas, perros, roedores (por ejemplo, ratón o rata), cobaya, cabra, cerdo, gato, conejo, y vaca. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

En ciertos ejemplos, las composiciones para uso en métodos para tratar AML pueden incluir una etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una primera población de células T transducidas con un primer gen CD123CAR, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de una segunda población de células T transducidas con un segundo gen CD123CAR.

En otras realizaciones, las células T transducidas con CD123CAR se pueden administrar en combinación con una o más terapias contra el cáncer adicionales. "En combinación" o "en combinación con", como se usa aquí, significa en el transcurso del tratamiento del mismo cáncer en el mismo sujeto usando dos o más agentes, fármacos, sustancias terapéuticas, procedimientos, regímenes de tratamiento, modalidades de tratamiento, o una combinación de los mismos, en cualquier orden. Esto incluye la administración simultánea, así como en un orden temporalmente espaciado de hasta varios días separados. Tal tratamiento de combinación también puede incluir más de una única administración de uno o más de los agentes, fármacos, sustancias terapéuticas, procedimientos, regímenes de tratamiento, y modalidades de tratamiento. Además, la administración de los dos o más agentes, fármacos, sustancias terapéuticas, procedimientos, regímenes de tratamiento, modalidades de tratamiento, o una combinación de los mismos, puede ser mediante las mismas vías de administración o diferentes.

Las terapias contra el cáncer adicionales que se pueden usar según los métodos descritos aquí pueden incluir uno o más procedimientos contra el cáncer, modalidades de tratamiento, sustancias terapéuticas contra el cáncer, o una

combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las células T transducidas con CD123CAR se pueden administrar en combinación con uno o más procedimientos contra el cáncer o modalidades de tratamiento, que incluyen, pero no se limitan a, trasplante de células madre (por ejemplo, trasplante de médula ósea o trasplante de células madre de sangre periférica usando células madre alogénicas, células madre autólogas; o un trasplante no mieloablativo), terapia de radiación, o resección quirúrgica. En otras realizaciones, las células T transducidas con CD123CAR se pueden administrar en combinación con una o más sustancias o fármacos contra el cáncer que se pueden usar para tratar AML, incluyendo, pero sin limitarse a, sustancias quimioterapéuticas y otros fármacos contra el cáncer, sustancias inmunoterapéuticas, sustancias terapéuticas dirigidas, o una combinación de los mismos.

Las sustancias quimioterapéuticas y otros fármacos contra el cáncer que se pueden administrar en combinación con las células T transducidas con CD123CAR según las realizaciones descritas aquí incluyen, pero no se limitan a, ácido todo-trans-retinoico (ATRA), trióxido arsénico, antibióticos antraciclínicos y sus sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, hidroclicloruro de doxorubicina, hidroclicloruro de daunorrubicina, idarrubicina, mitoxantrona), agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, larmustina), análogos antimetabolitos (citarabina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, metotrexato), agentes desmetilantes (por ejemplo, decitabina, 5-azacitidina), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (por ejemplo, hidroxiaurea), inhibidores de topoisomerasas (por ejemplo, etopósido), alcaloides de la vinca (por ejemplo, sulfato de vincristina), o una combinación de los mismos (por ejemplo, "ADE", que es un tratamiento de combinación que incluye una combinación de citarabina (Ara-C), hidroclicloruro de daunorrubicina, y etopósido).

Las sustancias inmunoterapéuticas que se pueden administrar en combinación con las células T transducidas con CD123CAR según las realizaciones descritas aquí incluyen, pero no se limitan a, agentes moduladores inmunes (por ejemplo, inhibidores de STAT3, lenalidomida) y anticuerpos monoclonales terapéuticos. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos se pueden diseñar (i) para dirigirlos contra uno o más antígenos de AML, incluyendo, pero sin limitarse a, CD33 (por ejemplo, gemtuzumab, lintuzumab), MUC1 (por ejemplo, cantuzumab ravnansina, clivatuzumab tetraxetán, pentumomab); (ii) un antígeno de células B (por ejemplo, rituximab, ofatumumab); o un modulador de la vasculatura, tal como VEGF o VEGFR (por ejemplo, alacizumab pegol, bevacizumab, icrucumab, ramucirumab, ranibizumab).

Las sustancias terapéuticas dirigidas que se pueden administrar en combinación con las células T transducidas con CD123CAR según las realizaciones descritas aquí incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de tirosina cinasas (imatinib, dasatinib, nilotinib, sunitinib), inhibidores de farnesil transferasa (por ejemplo, tipifarnib), inhibidores de FLT, e inhibidores de c-Kit (o CD117) (imatinib, dasatinib, nilotinib).

EJEMPLO 1: CÉLULAS T TRANSDUCIDAS CON CD123CAR EXHIBEN UNA POTENTE ACTIVIDAD CITOLÍTICA Y MÚLTIPLES FUNCIONES EFECTORAS FRENTE A AML IN VITRO

Materiales y métodos

Estirpes celulares. Excepto que se señale de otro modo, todas las estirpes celulares se mantienen en RPMI 1640 (Irvine Scientific) suplementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 25 mM, y 10% de FCS inactivado por calor (Hyclone), denominado aquí en lo sucesivo como medio completo (CM). Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se transformaron con el virus de Epstein-Barr para generar estirpes celulares linfoblastoides (LCL) como se describió previamente [19]. Las células LCL-OKT3 expresan OKT3 unido a la membrana, y se hacen crecer en CM suplementado con 0,4 mg/ml de higromicina [20]. Las células K562 se obtuvieron de ATCC, y se cultivaron como se recomendó. Las células KG1a (proporcionadas amablemente por el Dr. Ravi Bhatia) se mantuvieron en IMDM (Irvine Scientific) con HEPES 25 mM, L-glutamina 4 mM (Irvine Scientific), y 20% de FCS. Las células 293T (un regalo procedente amablemente del Center for Biomedicine and Genetics en City of Hope) se mantuvieron en DMEM + 10% de FCS inactivado por calor.

Muestras de AML primarias. Las muestras de AML primarias se obtuvieron de sangre periférica de pacientes (denominadas aquí como ID de Muestra de AML n^{os} 179, 373, 493, 519, 545, 559, 605, 722 y 813). En la Tabla 1, a continuación, se resumen las características de las muestras.

[La Tabla 1 está en la siguiente página]

Tabla 1. Características de muestras de AML primarias

ID de la muestra de AML	Edad/Sexo	Citogenética	Estado mutacional de Flt3	Estado clínico	Tipo de muestra	CD123 (RFI) ^a	CD123 % positivo
179	74/M	Riesgo intermedio t(1;7), t(14;15)	ND	Recayó	PB	428,32	99,22
373	47/M	Poco riesgo Anomalías complejas en 3 estirpes celulares	ND	Recayó	PB	1052,83	99,66
493	46/F	Riesgo intermedio Trisomía 8	ND	Recayó	PB	23,98	76,80
519	44/F	del(17p), dic (11;7), pérdida clonal de TP53/17p13.1	ND	Recayó	PB	63,18	97,40
545	58/M	Riesgo intermedio t(3;6), del(7)	ND	Fallo de inducción	PB	52,73	99,32
559	59/M	Anomalías complejas, hiperdiploidía masiva	Negativo	Recayó	Aféresis	9,30	45,0
605	55/M	Normal	Negativo	Persistente	PB	58,48	99,91
722	22/M	Riesgo intermedio t(14;21), del(9q)	Negativo	No tratado	PB	33,53	92,74
813	48/F	Anomalías complejas, Trisomía 8, Trisomía 21, add(17)	ND	No tratado	PB	37,19	90,93

^a El Índice de Fluorescencia Relativa (RFI) es la relación de la mediana de la señal teñida con 9F5 a la tinción del control de igual isotipo en la población de CD34⁺

^b Acotado en la población de CD34⁺

ND – no determinado

PB – sangre periférica

- 5 Citometría de flujo. Los controles de isotipo conjugados con fluorocromo, anti-CD4, anti-CD8, anti-receptor $\alpha\beta$ de células T (TCR $\alpha\beta$), anti-CD123 (9F5), anti-CD34 (8G12), y anti-CD38 (HIT2) se adquirieron de BD Biosciences. Anti-Fc biotinilado se adquirió de Jackson ImmunoResearch Laboratories. Cetuximab biotinilado (Erbix) se adquirió de la farmacia COH, y se ha descrito previamente [20]. Anti-CD2, anti-CD3, anti-CD7, anti-CD10, anti-CD11b, anti-CD19, anti-CD33, y anti-CD235A biotinilados se adquirieron de eBioscience. La adquisición de los datos se llevó a cabo en un FACSCalibur, LSRII (BD Biosciences), o MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec), y se analizó usando FCS Express, Versión 3 (De Novo Software).
- 10 Transfección de células 293T con CD123. ADNc de CD123 se amplificó a partir de CD123-pMD18-T (Sino Biological Inc.) usando la reacción en cadena de la polimerasa y los cebadores (CD123-F: 5'-ATAAGGCCTGCCGCCACCATGGTCCTCCTTTGGCTCACG-3' y CD123-R 5'-ATAGCTAGCTCAAGTTTTCTGCACGACCTGTACTTC-3'). El producto de la PCR se clonó en pMGpac usando los sitios de restricción Stul y NheI. Las células 293T se transfectaron usando Lipofectamine 2000 (Life Technologies)
- 15 según las instrucciones del fabricante. 24 horas después de la transfección, la expresión de CD123 se confirmó mediante citometría de flujo.

Generación de vectores lentivíricos. Para generar los constructos de CAR usados en este estudio, se sintetizaron (GENEART) secuencias de ADN con codones optimizados que codifican las cadenas VH y VL, una bisagra de IgG4 modificada y un dominio transmembránico de CD28 modificado (RLLH → RGGH [22]), y se clonaron en

CD19RCAR-T2AEGFRt_epHIV7 [20] usando los sitios NheI y RsrII para sustituir el CD19RCAR. El lentivirus se produjo transfecando células 293T con un vector lentivírico y los vectores de empaquetamiento pCMV-Rev2, pCHGP-2, y pCMV-G usando el kit de transfección de células de mamífero CalPhos™ (Clontech). Estos constructos de CAR 26292 y 32716 también se denominan aquí como 26292CAR(S228P+L235E) o 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) (Figuras 11 y 13) y 32716CAR(S228P+L235E) o 32716CAR(S228P+L235E+N297Q) (Figuras 10 y 12). Los sobrenadantes lentivíricos se recogieron a 24, 48 y 72 horas tras la transfección, y se concentraron mediante ultracentrifugación.

Transducción de PBMCs de donantes sanos y de pacientes con AML. Se obtuvieron PBMCs despersonalizados a partir de donantes sanos y de pacientes bajo protocolos aprobados por la junta de revisión institucional. Para los donantes sanos, las células T se activaron usando OKT3 (30 ng/ml) en CM suplementado 3 veces una semana con 25 U/ml de IL-2 y 0,5 ng/ml de IL-15 (denominado aquí como medio de células T). 72 horas tras la activación, las células T se inocularon de forma centrífuga con lentivirus a una MOI = 3 centrifugando durante 30 minutos a 800g y 32°C. La expresión de CAR se analizó mediante citometría de flujo 12-14 días tras la transducción lentivírica. Las células T que expresan EGFRt se enriquecieron como se describió previamente [20]. Las células T se expandieron en medio de células T mediante el método de expansión rápida [23].

Para la modificación genética de células T procedentes de pacientes con AML, sangre periférica descongelada o producto de aféresis se estimuló usando Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28 (Life Technologies), a una relación de perlas:células CD3+ de 3:1 en medio de células T. 72 horas tras la estimulación de las perlas, las células se inocularon de forma centrífuga con lentivirus a una MOI = 3. Las perlas se retiraron 9-14 días después de la estimulación inicial usando un imán DynaMag™-50 (Life Technologies), y las células T se mantuvieron en medio de células T. Las estirpes de células T derivadas de pacientes con AML que expresan CAR no se seleccionaron inmunomagnéticamente antes del uso en ensayos de exterminio.

Ensayo de proliferación de CFSE. Células T se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína 0,5 µM (CFSE; Molecular Probes) según las instrucciones del fabricante. Las células T marcadas se cocultivaron con, o sin, células estimulantes, a una relación E:T de 2:1 en CM suplementado con 10 U/ml de IL-2. Después de 72-96 horas, las células se cosecharon y se tiñeron con cetuximab biotinilado, así como con yoduro de propidio o DAPI, para excluir del análisis a las células muertas. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar la proliferación de células vivas EGFRt positivas mediante dilución de CFSE.

Ensayo de liberación de cromo y ensayo de secreción de citocina. Las células diana se marcaron durante 1 hora con ⁵¹Cr (PerkinElmer), se lavaron cinco veces, y se repartieron en alícuotas por triplicado a 5 X 10³ células/pocillo con células efectoras a diversas relaciones de efector a diana (E:T). Tras un cocultivo durante 4 horas, los sobrenadantes se cosecharon, y la radioactividad se midió usando un contador gamma o un Topcount (PerkinElmer). La lisis específica en porcentaje se calculó como se describió previamente [24]. La producción de citocina tras un cocultivo de 24 horas a una relación E:T de 10:1 se midió como se describió previamente [25].

Desgranulación de CD107a y producción de citocina intracelular. Se cocultivaron células T con células diana a una E:T de 2:1 durante seis horas a 37°C en presencia de GolgiStop™ (BD Biosciences) y anticuerpo anti-clon H4A3 de CD107a o anti-control de isotipo coincidente. Al finalizar las seis horas de incubación, las células se cosecharon, se lavaron y se tiñeron con anti-CD3, CD4, CD8, y cetuximab biotinilado, seguido de una tinción secundaria usando estreptavidina conjugada con PE. Las células se fijaron entonces y se permeabilizaron (Cytfix/Cytoperm™ BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante, y se tiñeron con anti-IFN-γ (clon B27 de BD Biosciences) y anti-TNF-α (clon MAb11 de BD Biosciences). La adquisición de datos se llevó a cabo usando el analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec), y el análisis se realizó usando FCS Express Versión 3 (De Novo Software).

Ensayo celular formador de colonias. Se seleccionaron células CD34+ procedentes de células mononucleares de sangre del cordón (CB) o muestras de AML primarias, usando separación en columna inmunomagnética (Miltenyi Biotec). Se cocultivaron 103 células CB CD34+ con 25 X 10³ células efectoras durante 4 horas antes de la siembra en placas en cultivo progenitor de metilcelulosa semisólido en pocillos por duplicado [26]. 14 a 18 días más tarde, se enumeraron las colonias de granulocitos-macrófagos de unidades formadoras de colonia (CFU-GM) y de eritroides de unidades formadoras de estallido (BFUE). Para las muestras de AML, se cocultivaron 5 X 10³ células de AML CD34+ con 125 X 10³ células efectoras durante 4 horas antes de la siembra en placas en cultivo progenitor de metilcelulosa semisólido en pocillos por duplicado.

Análisis estadístico. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando Graphpad Prism v5.04. Para identificar diferencias significativas entre grupos de tratamiento, se usó la prueba de la t de Student no emparejada.

Resultados

Generación de células T que expresan CD123 CAR

Para redirigir la especificidad de células T, se desarrollaron vectores lentivíricos que codifican CD123 CARs. Cada uno de los CARs incluye secuencias con codones optimizados que codifican uno de dos scFvs específicos de CD123, 26292 y 32716 [18], respectivamente. Los scFvs se fusionan en el marco a la región de Fc de IgG4 humana, un dominio coestimulante de CD28, y el dominio de señalización de CD3ζ. Justo en dirección 3' de la secuencia de

CAR se encuentra una secuencia de omisión de ribosoma T2A y un marcador de transducción de EGFR humano truncado (EGFRt) (Figura 1A). Las PBMCs estimuladas con OKT3 procedentes de donantes sanos se transdujeron lentíviricamente, y las células T que expresan CAR se aislaron mediante selección inmunomagnética usando anticuerpo Erbitux biotinilado, seguido de una tinción secundaria con perlas magnéticas anti-biotina. Tras un ciclo de REM, las células aisladas se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión superficial de CAR y el fenotipo de las células T. Tanto la expresión de FC como de EGFRt fue mayor que 90% en las estirpes de células T generadas procedentes de tres donantes sanos, y los productos de células T finales consistieron en una mezcla de células T CD4 y CD8 positivas (Figura 1B, 1C).

Células T modificadas por CD123 CAR seleccionan específicamente a estirpes celulares tumorales que expresan CD123

Para confirmar la especificidad de las células T modificadas con CD123 CAR, se examinó la capacidad de las células T genéticamente modificadas para lisar células 293T transfectadas transitoriamente para expresar CD123 (293T-CD123; Figura 2A). Ambas células T modificadas con CD123 CAR generadas lisaron eficientemente células 293T-CD123, pero no células 293T transfectadas transitoriamente para expresar CD19, demostrando el reconocimiento específico de CD123 (Figura 2B). A continuación, se investigó la capacidad citolítica *in vitro* de células T específicas de CD123 frente a estirpes celulares tumorales que expresan endógenamente CD123. La expresión de CD123 en las estirpes celulares LCL y KG1a se confirmaron mediante citometría de flujo (Figura 2C). Ambas estirpes de células T específicas de CD123 lisaron eficientemente las estirpes diana LCL y KG1a, pero no la estirpe celular CD123-K562 (Figura 2C). Las células T específicas de CD19 con pares coincidentes lisaron eficazmente las dianas de LCL CD19+, pero no las dianas CD19- KG1a o K562 (Figura 2D). Las células progenitoras transducidas de forma simulada lisaron solamente la estirpe celular LCL-OKT3 de control positivo (Figura 2D).

Células T modificadas con CD123 CAR activan múltiples funciones efectoras cuando se cocultivan con células diana CD123-positivas

Para examinar la función efectora de células T específicas de CD123, se midió la secreción de IFN- γ y TNF- α tras el cocultivo con diversas estirpes celulares tumorales. Los productos de células T que expresan CD123 CAR produjeron tanto IFN- γ como TNF- α cuando se cocultivaron con células diana CD123+, mientras que las células T específicas de CD19 con pares coincidentes segregaron estas citocinas solamente cuando se cocultivaron con la estirpe celular CD19+ LCL o LCL-OKT3 (Figura 3A). Adicionalmente, ambas estirpes de células T específicas de CD123 proliferaron cuando se cocultivaron con cualquiera de las estirpes celulares CD123+ LCL, LCL-OKT3, o KG1a, pero no con la estirpe celular CD123- K562 (Figura 3B). Por el contrario, las células T que expresan CD19 CAR con pares coincidentes proliferaron solamente cuando se cocultivaron con LCL o LCL-OKT3 (Figura 3B).

Células T modificadas con CD123 CAR activan múltiples funciones efectoras cuando se cocultivan con muestras de AML primarias

La sobreexpresión de CD123 en muestras de AML primarias está bien documentada [27-29], y se confirmó en este estudio (Figura 14). Las respuestas de células T de múltiples facetas son críticas para respuestas inmune robustas frente a infecciones y vacunas, y también pueden desempeñar un papel en la actividad antitumoral de células T dirigidas por CAR [30]. Para investigar la capacidad de células T modificadas con CD123 CAR para activar múltiples rutas efectoras frente a muestras de AML primarias, se cocultivaron células T modificadas con tres muestras de pacientes con AML diferentes (179, 373, y 605) durante 6 horas, y se evaluaron para determinar el aumento de CD107a y la producción de IFN- γ y TNF- α usando citometría de flujo policromática (estrategia de acotamiento mostrada en la Figura 15). La movilización en la superficie celular de CD107a se observó tanto en los compartimentos de CD4 como de CD8 de células T específicas de CD123, mientras que las células T específicas de CD19R con pares coincidentes no produjeron desgranulación apreciable frente a muestras de AML primarias (Figura 4A, gráfica de barras). Además, las subpoblaciones de células T CD107a+ CD123 CAR también produjeron IFN- γ , TNF- α , o ambas citocinas (Figura 4A, gráficas circulares). Esta respuesta multifuncional se observó para las poblaciones tanto de CD4 como de CD8 (Figura 4A y 4B). Adicionalmente, se examinó la capacidad de células T modificadas con CAR para proliferar en respuesta al cocultivo con muestras de AML primarias. Ambas estirpes de células T específicas de CD123 fueron capaces de proliferar tras el cocultivo con muestras de AML 813 o B-ALL 802 (Figura 4C). Se observó proliferación para las poblaciones tanto de CD4 como de CD8 (Figura 16). Las células T específicas de CD19 con pares coincidentes proliferaron cuando se cocultivaron con CD19+ pre B-ALL 802, pero no cuando se cocultivaron con AML 813.

Células T que expresan CD123 CAR se dirigen contra células de AML primarias *in vitro*

Células T específicas de CD123 no eliminan la formación de colonias por células de sangre de cordón *in vitro*

Dado que CD123 se expresa en progenitores mieloides comunes (CMPs) [31], se investigó el efecto de las células T modificadas sobre la capacidad formadora de colonias de muestras de sangre de cordón (CB) normales enriquecidas con CD34. La formación de colonias mieloides y eritroides por las muestras de CB no se redujo significativamente tras un cocultivo de 4 horas con células T que expresan CD123-CAR a una E:T de 25:1, cuando

se comparan con células T que expresan CD19R CAR T con pares coincidentes (Figura 6 A y B). A continuación, se examinó *in vitro* la capacidad de las células T específicas de CD123 para inhibir el crecimiento de células AML clonogénicas primarias. Ambas estirpes de células T que expresan CD123 CAR disminuyeron significativamente la formación de colonias leucémicas en comparación con células T que expresan CD19R con pares coincidentes (Figura 6C). En particular, las células T específicas de CD123 tuvieron un mayor impacto sobre la formación de colonias leucémicas en comparación con la formación de colonias mieloides normales (Figura 6D, reducción de 69% frente a reducción de 31%, respectivamente).

Células T procedentes de pacientes con AML se pueden modificar genéticamente para expresar CD123 CARs y seleccionar específicamente células tumorales autólogas

Se sabe que las células T derivadas de pacientes con AML no repolarizan bien la actina, y forman sinapsis inmunes defectuosas con blastos autólogos [32]. Adicionalmente, según nuestro conocimiento, las células T que expresan CAR derivadas de pacientes con AML todavía se han de describir. Por lo tanto, se determinó si las células T procedentes de pacientes con AML se podrían modificar genéticamente para expresar CARs específicos de CD123. PBMCs crioconservadas (AML 605 y AML 722) o producto de aféresis (AML 559) se estimularon con perlas de CD3/CD28, y se transdujeron lentivíricamente para expresar los CARs de CD123 o un CAR de control de CD19R. Todas las células T derivadas de muestras de las tres muestras de pacientes expresaron el 26292 CAR (eficiencia de la transducción 40-65%), el 32716 CAR (eficiencia de la transducción 46-70%) y el CD19R CAR (para evaluar la capacidad de las células T específicas de CD123 para exterminar células de AML primarias, se cocultivaron células T que expresan CD19R CAR o CD123 CAR con pares coincidentes con muestras de pacientes con AML enriquecidas con CD34 primarias, en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas. En contraste con las células T de CD19R con pares coincidentes, ambas estirpes de células T de CD123 CAR lisaron robustamente todas las muestras de pacientes con AML primarias ensayadas (Figura 5A). Adicionalmente, mientras que no se observó diferencia estadística entre la capacidad citolítica de las células T que expresan CD123 CAR, ambas células T específicas de CD123 demostraron una citotoxicidad significativamente potenciada cuando se comparan con las células T de CD19R-CAR con pares coincidentes (Figura 5B).

23-37% de eficiencia de la transducción). Un ejemplo representativo del fenotipo de células T de CAR derivadas de pacientes con AML se muestra en la Figura 7A. A continuación, se examinó el potencial citolítico de células T de CAR derivadas de pacientes con AML frente a células diana enriquecidas con CD34 autólogas en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas. Todas las células enriquecidas con CD34 autólogas expresaron CD123, aunque en porcentajes e intensidades variables (Figura 7B). Las células T derivadas de AML 605 y 722 lisaron eficientemente blastos autólogos, mientras que las células T derivadas de AML 559 presentaron bajos niveles de lisis de blastos autólogos, probablemente debido a la expresión baja y heterogénea de CD123 en blastos de AML 559 (Figura 7C).

Discusión

Las realizaciones descritas aquí incluyen la generación de dos nuevos CARs dirigidos contra CD123 usando scFvs procedente de inmunotoxinas recombinantes (RITs), 26292 y 32716, que se unen a epítomos distintos y tienen afinidades de unión similares por CD123 [18]. Cuando se expresan mediante una población de células T, estos CARs dirigidos contra CD123 redirigen la especificidad de las células T frente a células que expresan CD123. Usando un ensayo de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) de 4 horas estándar, células T de donantes sanos que se manipularon para expresar los CD123 CARs lisaron eficientemente estirpes celulares CD123+ y muestras de pacientes con AML primaria. Adicionalmente, ambas células T CD123 CAR activaron múltiples funciones efectoras tras el cocultivo con estirpes celulares CD123+ y muestras de pacientes con AML primaria. Además, las células T dirigidas contra CD123 no redujeron significativamente el número de colonias de granulocitos-macrófagos de unidades formadoras de colonias (CFU-GM) o de colonias de eritroides de unidades formadoras de estallido (BFU-E) procedentes de sangre del cordón (CB) cuando se compararon con células T CD19 CAR. En particular, mientras que las células T específicas de CD19 tuvieron poco impacto sobre la formación de colonias leucémicas de muestras de AML primarias, las células T dirigidas contra CD123 redujeron significativamente la formación de colonias leucémicas *in vitro*. También se mostró que las células T derivadas de pacientes con AML pueden expresar CD123 CARs y lisar blastos autólogos *in vitro*.

Las células T que expresan cualquiera de los dos CARs específicos de CD123 pueden lisar específicamente estirpes celulares que expresan CD123 y muestras de pacientes con AML primarias, y activan múltiples funciones efectoras de una manera específica del antígeno *in vitro*, demostrando que ambos epítomos son dianas potenciales para el tratamiento. No se observaron diferencias importantes entre las estirpes de células T modificadas con CD123 CAR con respecto al exterminio de células diana, con respecto a la secreción de citocina, o con respecto a la proliferación, cuando se cocultivan con células CD123+. Una posible explicación para esto son las afinidades de unión de los scFvs específicos de CD123 usados en los CD123-CARs, que están en el intervalo nanomolar y difieren en menos de 3 veces, y de este modo no ofrecen ninguna ventaja significativa en la unión al antígeno diana conferida por cualquiera de los scFv [18].

La expresión de múltiples antígenos de la superficie celular en células de AML se ha documentado bien [4, 27, 34]. La dianización de algunos de estos antígenos vía células T que expresan CAR puede no ser factible. Por ejemplo, el antígeno TIM-3 asociado a AML se expresa en un subconjunto de células T agotadas [35, 36], y la dianización de

TIM-3 usando células T modificadas con CAR puede dar como resultado la autólisis de células genéticamente modificadas. Adicionalmente, CD47 se expresa ubicuamente [37], y de este modo no puede ser seleccionable como diana por las células T manipuladas con CAR. El antígeno de diferenciación CD33 se expresa predominantemente en células mieloides, y actualmente se usan en marcos clínicos y preclínicos inmunoterapias dirigidas contra CD33, tales como gemtuzumab ozogamicina, anticuerpos que se acoplan a células T biespecíficos de CD33/CD3, y un CD33 CAR [17, 38, 39]. Al igual que TIM-3, CD33 es expresado en un subconjunto de células T, haciéndolo una diana no ideal para una terapia a base de CAR [40]. Adicionalmente, la actividad antileucémica de terapias dirigidas contra CD33 iba acompañada a menudo con una lenta recuperación de la hematopoyesis y de citopenias, probablemente el resultado de la expresión de CD33 en células madre hematopoyéticas normales que se autorrenuevan a largo plazo (HSCs) [41]. Además, las hepatotoxicidades son un efecto secundario común de tratamientos dirigidos contra CD33, y son posiblemente debidas a la dianización no pretendida de células de Kupffer CD33+ [42].

La expresión de CD123 está ausente en células T, restringida predominantemente a células de la estirpe mieloide [43], y está muy ausente en HSCs [27]. Juntas, estas observaciones hacen a CD123 una diana atractiva para la terapia con células T mediada por CAR. Las sustancias terapéuticas específicas para CD123 han presentado perfiles de seguridad favorables en ensayos clínicos de fase I (ClinicalTrials.gov ID: NCT00401739 y NCT00397579). Desafortunadamente, estas terapias han fracasado para inducir respuestas en la inmensa mayoría de los pacientes tratados. Las células T que expresan CD123-CAR generadas presentan aquí una potente capacidad citolítica *in vitro* frente a estirpes celulares CD123+ y muestras de AML primarias. Los estudios descritos más abajo muestran que las muestras primarias procedentes de pacientes con AML de bajo riesgo fueron susceptibles a citotoxicidad mediada por células T CD123 CAR. Colectivamente, en la pequeña cohorte de muestras primarias usada para ensayos de citotoxicidad a corto plazo, las muestras de pacientes con AML que exhibieron características de alto riesgo en el diagnóstico y/o son quimiorresistentes fueron sensibles al exterminio mediante CD123 CAR, de forma similar a lo que se observó en experimentos usando estirpes de células CD123+. Se necesitará realizar más análisis para confirmar que estos resultados serán ciertos para una cohorte más grande de muestras.

Respuestas de células T multifuncionales se correlacionan con el control de la infección vírica, y pueden ser importantes en una respuesta de células T CAR antitumoral [44]. De hecho, los pacientes sensibles a la terapia con células T CD19 CAR tienen respuestas de células T detectables (es decir, desgranulación, secreción o proliferación de citocinas) tras la terapia en respuesta a dianas CD19+ *ex vivo* [11, 12, 14]. En los Ejemplos más abajo, se demostró que la funcionalidad de células T que expresan CD123-CAR analizando el aumento de CD107a, la producción de citocinas inflamatorias y la proliferación de células T específicas de CD123 en respuesta tanto a estirpes de células CD123+ como a muestras de AML primarias. Además, se observó multifuncionalidad en los compartimentos tanto de CD4+ como de CD8+, que puede promover actividad antileucémica sostenida y alentar la actividad antileucémica en el microentorno tumoral [45, 46]. La inclusión de otros dominios coestimulantes, tal como 4-1BB, y el uso de células T “más jóvenes” menos diferenciadas pueden aumentar adicionalmente las respuestas de CD123 CAR, y son un área de investigación activa [9, 47].

Además, las células T específicas de CD123 no inhiben la formación de colonias progenitoras normales – incluso a una E:T de 25:1. La expresión de CD123 en células linaje-CD34+CD38- es un signo distintivo de la célula progenitora mieloide común, y de este modo una diana probable de células T CD123 CAR [31]. Mientras que se observó una disminución en el porcentaje relativo de colonias derivadas de mieloides cuando se incubaron células de CB con células T específicas de CD123, la disminución no fue significativamente menor que las células T CD19R CAR con pares coincidentes. Es posible que el tamaño limitado de las muestras se atribuya a este resultado, y una experimentación adicional puede revelar una disminución significativa en la formación de CFU-GM en muestras de sangre de cordón tratadas con células T CD123 CAR. Adicionalmente, el cocultivo durante 4 horas de células T y células de CB antes de la colocación en placas puede no ser un período de tiempo suficientemente grande para observar un efecto sobre la formación de colonias progenitoras mieloides normales, y que tiempos de incubación más largos pueden disminuir el número de colonias derivadas de mieloides observadas. Sin embargo, usando la misma metodología como la que se usó para células de CB, se observó una disminución sustancial en el número de colonias leucémicas formadas cuando se incubaron muestras de pacientes con AML enriquecidas con CD34 primarias con células T CD123 CAR, sugiriendo que el tiempo de incubación de 4 horas es suficiente para observar un efecto entre la formación de colonias leucémicas y colonias normales. Como alternativa, la menor expresión relativa de CD123 en células de CB, en comparación con células de AML, puede dar en parte como resultado la incapacidad de las células T CD123 CAR para alterar la formación de colonias derivadas de mieloides *in vitro*. Mientras otros han demostrado que CD123 se expresa solamente en una pequeña fracción de las HSCs linaje-CD34+CD38-, y dos ensayos de fase I que usan agentes dirigidos contra CD123 no revelaron mielosupresión a largo plazo, se necesitan estudios adicionales para evaluar el efecto de la terapia de células T CD123 CAR sobre la hematopoyesis. A fin de controlar toxicidades indeseadas inespecíficas, se incluyó EGFRt en el constructo lentivírico para permitir la ablación de células T que expresan CAR. Otras estrategias para modular la actividad de células T que expresan CAR, tales como el intercambio de apoptosis de caspasa 9 inducible [48] o la electroporación de ARNm de CAR [49], también son de interés, dado el potencial para exterminar células normales que expresan CD123.

Además, se demostró que las PBMCs crioconservadas procedentes de pacientes con AML con enfermedad activa

se pueden modificar genéticamente para expresar CD123 CARs y exhibir actividad citotóxica potente frente a blastos leucémicos autólogos en 2/3 de las muestras. Mientras que las células T que expresan CD123 CAR procedentes de AML 559 fracasaron a la hora de lisar blastos autólogos que expresaron niveles bajos de CD123, estas células T de CAR sí lisaron las estirpes celulares CD123+ LCL y KG1a (datos no mostrados), sugiriendo que las células T generadas tienen el potencial de diana células diana que expresan CD123. Según nuestro conocimiento, esta es la primera demostración de que las células T derivadas de pacientes con AML se pueden manipular para expresar un CAR y exhiben citotoxicidad específica del antígeno redirigida contra blastos autólogos.

Colectivamente, los resultados de los estudios descritos en los Ejemplos más abajo demuestran que las células T CD123 CAR pueden distinguir entre células CD123+ y CD123-, y pueden activar múltiples funciones efectoras de células T frente a un panel de muestras de pacientes con AML primarias de bajo riesgo. En particular, células T específicas de CD123 no alteraron significativamente la formación de colonias progenitoras normales, pero redujeron considerablemente el crecimiento de progenitores leucémicos mieloides clonogénicos *in vitro*. También se demostró que células T derivadas de pacientes con AML se pueden modificar genéticamente para expresar CARs específicos de CD123 y lisar blastos autólogos *in vitro*. Por lo tanto, las células T CD123 CAR son un candidato prometedor para la inmunoterapia de AML.

EJEMPLO 2: CÉLULAS T TRANSDUCIDAS CON CD123CAR RETRASAN LA PROGRESIÓN LEUCÉMICA IN VIVO

Constructos de CD123CAR. Los constructos 26292CAR(S228P+L235E) y 32716CAR(S228P+L235E) se generaron como se describió en el Ejemplo 1 anterior. También se generaron dos constructos adicionales de CD123CAR, que incluyeron una mutación adicional en la bisagra de IgG4 en la posición 297 (N297Q) para cada scFv (“26292CAR(S228P+L235E+N297Q)” y “32716CAR(S228P+L235E+N297Q)”) (Figuras 12 y 13, mutaciones en negrita y subrayadas).

Se implantaron a ratones NSG células tumorales de AML (día 0), y se trataron con $5,0 \times 10^6$ células T CAR+ que expresan el 26292CAR(S228P+L235E) o el 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) en el día 5, y se monitorizó la progresión leucémica mediante formación de imágenes bioluminiscentes. Como se muestra en la Figura 8, la carga leucémica progresó en el día 8 en comparación con el día de tratamiento en ratones tratados con células T transducidas con 26292CAR(S228P+L235E), indicando que las células transducidas con el constructo de CD123CAR que tiene mutaciones en la región bisagra en las posiciones S228P y L235E no tuvieron ningún efecto *in vivo*. Por el contrario, los ratones tratados con células T transducidas con 26292CAR(S228P+L235E+N297Q) mostraron una reducción en el tamaño tumoral en comparación con el día de tratamiento, indicando que la adición de una mutación en la región bisagra en la posición 297 (N297Q) da como resultado un constructo de CD123CAR que es capaz de retrasar la progresión leucémica *in vivo*.

REFERENCIAS

Las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas enumeradas más abajo son todas las referencias citadas en la memoria descriptiva.

1. Eaves, C.J. and R.K. Humphries, Acute myeloid leukemia and the Wnt pathway. *N Engl J Med*, 2010. 362(24): p. 2326-7.
2. Dohner, H., et al., Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 2010. 115(3): p. 453-74.
3. Majeti, R., Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells. *Oncogene*, 2011. 30(9): p. 1009-19.
4. Kikushige, Y., et al., TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010. 7(6): p. 708-17.
5. Jena, B., G. Dotti, and L.J. Cooper, Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 2010. 116(7): p. 1035-44.
6. Cooper, L.J., et al., T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood*, 2003. 101(4): p. 1637-44.
7. Hudecek, M., et al., The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 2010. 116(22): p. 4532-41.
8. Kochenderfer, J.N., et al., Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother*, 2009. 32(7): p. 689-702.
9. Milone, M.C., et al., Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. *Mol Ther*, 2009. 17(8): p. 1453-64.

10. Brentjens, R.J., et al., Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*, 2003. 9(3): p. 279-86.
11. Brentjens, R.J., et al., Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory Bcell leukemias. *Blood*, 2011. 118(18): p. 4817-28.
- 5 12. Kochenderfer, J.N., et al., B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 2011.
13. Savoldo, B., et al., CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest*, 2011. 121(5): p. 1822-6.
- 10 14. Kalos, M., et al., T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced Leukemia. *Sci Transl Med*, 2011. 3(95): p. 95ra73.
- 15 15. Till, B.G., et al., CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*, 2012.
16. Peinert, S., et al., Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen. *Gene Ther*, 2010. 17(5): p. 678-86.
- 15 17. Dutour, A., et al., In Vitro and In Vivo Antitumor Effect of Anti-CD33 Chimeric Receptor-Expressing EBV-CTL against CD33 Acute Myeloid Leukemia. *Adv Hematol*, 2012. 2012: p. 683065.
18. Du, X., M. Ho, y I. Pastan, New immunotoxins targeting CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells. *J Immunother*, 2007. 30(6): p. 607-13.
- 20 19. Pelloquin, F., J.P. Lamelin, y G.M. Lenoir, Human B lymphocytes mmortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1986. 22(12): p. 689-94.
20. Wang, X., et al., A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*, 2011. 118(5): p. 1255-63.
21. Reddy, M.P., et al., Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J Immunol*, 2000. 164(4): p. 1925-33.
- 25 22. Nguyen, P., I. Moisini, y T.L. Geiger, Identification of a murine CD28 dileucine motif that suppresses single-chain chimeric T-cell receptor expression and function. *Blood*, 2003. 102(13): p. 4320-5.
23. Jensen, M.C., et al., Human T lymphocyte genetic modification with naked DNA. *Mol Ther*, 2000. 1(1): p. 49-55.
- 30 24. Riddell, S.R. y P.D. Greenberg, The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods*, 1990. 128(2): p. 189-201.
25. Brown, C.E., et al., Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells. *Cancer Res*, 2009. 69(23): p. 8886-93.
26. Bhatia, R., et al., Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood*, 1995. 85(12): p. 3636-45.
- 35 27. Jordan, C.T., et al., The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*, 2000. 14(10): p. 1777-84.
28. Jin, L., et al., Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009. 5(1): p. 31-42.
- 40 29. Munoz, L., et al., Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica*, 2001. 86(12): p. 1261-9.
30. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(4): p. 247-58.
31. Manz, M.G., et al., Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(18): p. 11872-7.
- 45 32. Le Dieu, R., et al., Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood*, 2009. 114(18): p. 3909-16.

33. Oka, Y., et al., Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(38): p. 13885-90.
34. Majeti, R., et al., CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 2009. 138(2): p. 286-99.
- 5 35. Golden-Mason, L., et al., Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol*, 2009. 83(18): p. 9122-30.
36. Jin, H.T., et al., Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(33): p. 14733-8.
- 10 37. Brown, E.J. y W.A. Frazier, Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(3): p. 130-5.
38. Walter, R.B., et al., Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood*, 2012. 119(26): p. 6198-208.
39. Aigner, M., et al., T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE((R)) antibody construct. *Leukemia*, 2012.
- 15 40. Hernandez-Caselles, T., et al., A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J Leukoc Biol*, 2006. 79(1): p. 46-58.
41. Sievers, E.L., et al., Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*, 2001. 19(13): p. 3244-54.
- 20 42. Tsimberidou, A.M., et al., The role of gemtuzumab ozogamicin in acute leukaemia therapy. *Br J Haematol*, 2006. 132(4): p. 398-409.
43. Sato, N., et al., Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood*, 1993. 82(3): p. 752-61.
- 25 44. Appay, V., D.C. Douek, y D.A. Price, CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med*, 2008. 14(6): p. 623-8.
45. Moeller, M., et al., Sustained antigen-specific antitumor recall response mediated by gene-modified CD4+ T helper-1 and CD8+ T cells. *Cancer Res*, 2007. 67(23): p. 11428-37.
46. Schietinger, A., et al., Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase. *J Exp Med*, 2010. 207(11): p. 2469-77.
- 30 47. Gattinoni, L., et al., A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*, 2011. 17(10): p. 1290-7.
48. Straathof, K.C., et al., An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4247-54.
- 35 49. Yoon, S.H., et al., Adoptive immunotherapy using human peripheral blood lymphocytes transferred with RNA encoding Her-2/neu-specific chimeric immune receptor in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Gene Ther*, 2009. 16(6): p. 489-97.
50. Strohl, W.R., Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr Op Biotech*. 2009. 20:685-691.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> CITY OF HOPE FORMAN, Stephen MARDIROS, Armen
- <120> CÉLULAS T REDIRIGIDAS POR RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS ESPECÍFICOS DE CD123, Y MÉTODOS DE SU USO
- <130> 54435.8127.WO00
- <150> US 13/844,048
- 45 <151> 2013-03-15
- <160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2052

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica antisentido del constructo 32716CAR(S228P+L235E)

<400> 1

gctagcgccg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgcca gctgccccac	60
cccgctttc tgctgatccc ccagattcag ctggtgcaga gcggcccgga actgaaaaaa	120
ccgggcgaaa ccgtgaaaat tagctgcaaa gcgagcggct atatttttac caactatggc	180
atgaactggg tgaaacaggc gccgggcaaa agctttaaat ggatgggctg gattaacacc	240
tataccggcg aaagcaccta tagcgcggat tttaaaggcc gctttgcggt tagcctgaa	300
accagcgca gcaccgcgta tctgcatatt aacgatctga aaaacgaaga taccgcgacc	360
tatttttgcg cgcgcagcgg cggctatgat ccgatggatt attggggcca gggcaccagc	420
gtgaccgtga gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc	480
gatattgtgc tgaccagag cccggcagc ctggcggta gcctgggcca gcgcgcgacc	540
attagctgcc gcgcgagcga aagcgtggat aactatggca acacctttat gcattggtat	600
cagcagaaac cgggccagcc gccgaaactg ctgatttacc gcgcgagcaa cctggaaagc	660
ggcattccgg cgcgctttag cggcagcggc agccgcaccg atttaccct gaccattaac	720
ccggtggaag cggatgatgt ggcgacctat tattgccagc agagcaacga agatccgccg	780
acctttggcg cgggcaccaa actggaactg aaagagagca agtacggccc tccctgcccc	840
ccttgccctg cccccagtt cgagggcggc cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc	900
aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc	960
caggaagatc ccgaggtcca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc	1020
aagaccaagc ccagagagga acagttcaac agcacctacc gggcgggtgc tgtgctgacc	1080

10

ES 2 747 099 T3

gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1140
ctgcccagca gcatcgaaaa gaccatcagc aaggccaagg gccagcctcg cgagccccag 1200
gtgtacacc tgcctccctc ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1260
ctggtgaagg gcttctacc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct 1320
gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac 1380
agccggctga ccgtggacia gagccgggtg caggaagca acgtctttag ctgcagcgtg 1440
atgcacgagg ccctgcacia cactacacc cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag 1500
atgttctggg tgctggtggt ggtgggcggg gtgctggcct gctacagcct gctggtgaca 1560
gtggccttca tcatcttttg ggtgaggagc aagcggagca gaggcggcca cagcgactac 1620
atgaacatga ccccagacg gcctggcccc acccgggaagc actaccagcc ctacgcccc 1680
cccagggaact ttgccgcta ccggtccggc ggagggcggg tgaagttcag cagaagcggc 1740
gacgcccctg cctaccagca gggccagaat cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga 1800
aggaagagt acgacgtcct ggataagcgg agagccggg accctgagat gggcggcaag 1860
cctcggcggg agaaccccc ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggc 1920
gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc gagcggagc ggggcaaggg ccacgacggc 1980
ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgccctgca catgcaggcc 2040
ctgcccccaa gg 2052

<210> 2

<211> 2031

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica antisentido del constructo 26292CAR(S228P+L235E)

<400> 2

gctagcgcg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgca gctgccccac 60
ccgcctttc tgctgatccc ccaggtgcag ctgcagcagc cgggcgggga actggtgcmc 120
ccgggcgca gcgtgaaact gagctgcaaa ggcagcggct atacctttac cagctattgg 180
atgaactggg tgaacacagc cccggatcag ggcctggaat ggattggccg cattgatccg 240
tatgatagcg aaaccatta taaccagaaa tttaaagata aagcgattct gaccgtggat 300
aaaagcagca gcaccgcgta tatgcagctg agcagcctga ccagcgaaga tagcgcggtg 360
tattattgcm cgcgcggcaa ctgggatgat tattggggcc agggcaccac cctgaccgtg 420
agcagcggcg gcggcggcag cggcggcggc ggcagcggcg gcggcggcag cgatgtgcm 480
attaccaga gcccagcta tctggcggcg agcccggcg aaaccattac cattaactgc 540

10

ES 2 747 099 T3

cgcgcgagca aaagcattag caaagatctg gcgtggtatc aggaaaaacc gggcaaaacc 600
 aacaaactgc tgatttatag cggcagcacc ctgcagagcg gcattccgag ccgcttttagc 660
 ggcagcggca gcggcaccga tttaccctg accattagca gcctggaacc ggaagatttt 720
 gcgatgtatt attgccagca gcataacaaa tatccgtata cctttggcgg cggcaccaaa 780
 ctggaaatta aagagagcaa gtacggccct ccctgcccc cttgccctgc ccccaggttc 840
 gaggcgggac ccagcgtggt cctgttcccc cccaagccca aggacacccct gatgatcagc 900
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagatcc cgaggtccag 960
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa 1020
 cagttcaaca gcacctaccg ggtggtgtct gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 1080
 aacggcaaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaagggcc tgcccagcag catcgaaaag 1140
 accatcagca aggccaaggg ccagcctcgc gagccccagg tgtacaccct gcctccctcc 1200
 caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgcc tggatgaaggg cttctacccc 1260
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcctg agaacaacta caagaccacc 1320
 cctcccgtgc tggacagcga cggcagcttc ttcctgtaca gccggctgac cgtggacaag 1380
 agccggtggc aggaaggcaa cgtcttttagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1440
 cactacacc cagaagagcct gagcctgtcc ctgggcaaga tgttctgggt gctggtggtg 1500
 gtgggcgggg tgctggcctg ctacagcctg ctggtgacag tggccttcat catcttttgg 1560
 gtgcccagca agcgggagcag agcgggccac agcgactaca tgaacatgac ccccagacgg 1620
 cctggcccca cccggaagca ctaccagccc tacgccccac ccagggactt tgccgcctac 1680
 cggcctcggcg gaggcggggt gaagttcagc agaagcggcg acgcccctgc ctaccagcag 1740
 ggccagaatc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagaa gggaaagagta cgacgtcctg 1800
 gataagcggg gaggccggga ccctgagatg ggcggcaagc ctcgccggaa gaacccccag 1860
 gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc 1920
 atgaagggcg agcgggagcg gggcaagggc cacgacggcc tgtatcaggg cctgtccacc 1980
 gccaccaagg atacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgcccccaag g 2031

<210> 3

<211> 2052

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica antisentido del constructo 32716CAR(S228P+L235E+N297Q)

<400> 3

gctagcgcgg ccaccatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgcga gctgccccac 60

ES 2 747 099 T3

cccgcctttc tgctgatccc ccagattcag ctggtgcaga gcggcccgga actgaaaaaa 120
 ccgggcgaaa ccgtgaaaat tagctgcaaa gcgagcggct atatttttac caactatggc 180
 atgaactggg tgaaacaggc gccgggcaaa agctttaaat ggatgggctg gattaacacc 240
 tataccggcg aaagcaccta tagcgcggat ttaaaggcc gctttgcgtt tagcctggaa 300
 accagcgcga gcaccgcgta tctgcatatt aacgatctga aaaacgaaga taccgcgacc 360
 tatttttgcg cgcgcagcgg cggctatgat ccgatggatt attggggcca gggcaccagc 420
 gtgaccgtga gcagcggcgg cggcggcagc ggcgggcggc gcagcggcgg cggcggcagc 480
 gatattgtgc tgaccagag cccggcgagc ctggcgggtga gcctgggcca gcgocgacc 540
 attagctgcc gcgcgagcga aagcgtggat aactatggca acaccttat gcattggtat 600
 cagcagaaac cgggcccagcc gccgaaactg ctgatattatc gcgcgagcaa cctggaaagc 660
 ggcattccgg cgcgctttag cggcagcggc agccgcaccg attttacctt gaccattaac 720
 ccggtggaag cggatgatgt ggcgacctat tattgccagc agagcaacga agatccgccg 780
 acctttggcg cgggcaccaa actggaactg aaagagagca agtacggccc tcctgcccc 840
 ccttgccctg cccccagatt cgagggcgga cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc 900
 aaggacacc tgatgatcag ccggaccccc gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc 960
 caggaagatc ccgaggtcca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 1020
 aagaccaagc ccagagagga acagttccar agcacctacc ggggtggtgct tgtgctgacc 1080
 gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gcaaggtgct caacaagggc 1140
 ctgccagca gcatcgaaaa gaccatcagc aaggccaag gccagcctcg cgagccccag 1200
 gtgtacacc tgcctccctc ccaggaagag atgaccaaga accaggtgct cctgacctgc 1260
 ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct 1320
 gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac 1380
 agccggctga ccgtggacia gagccggtgg caggaaggca acgtctttag ctgcagcgtg 1440
 atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgagcctgct cctgggcaag 1500
 atgttctggg tgctggtggt ggtgggcggg gtgctggcct gctacagcct gctggtgaca 1560
 gtggccttca tcatcttttg ggtgcgagc aagcggagca gaggcggcca cagcgactac 1620
 atgaacatga ccccagacg gcctggcccc acccggagc actaccagcc ctacgcccc 1680
 cccagggact ttgccgcta ccggctccggc ggagggcggg tgaagtcag cagaagcgcc 1740
 gacgcccctg cctaccagca gggccagaat cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga 1800
 agggaagagt acgacgtcct ggataagcgg agaggccggg accctgagat gggcggcaag 1860
 cctcggcggg agaaccccc ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc 1920
 gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc gagcggaggc ggggcaaggg ccacgacggc 1980
 ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgccctgca catgcaggcc 2040
 ctgcccccaa gg 2052

<210> 4

<211> 2031

<212> ADN

ES 2 747 099 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica antisentido del constructo 26292CAR(S228P+L235E+N297Q)

<400> 4

gctagcgccg ccacatgct gctgctggtg accagcctgc tgctgtgca gctgccccac	60
ccgcctttc tgctgatccc ccagggtcag ctgcagcagc cgggcgcgga actggtgccc	120
ccgggcgca gcgtaaaact gagctgcaaa gcgagcggct atacctttac cagctattgg	180
atgaactggg tgaaacagcg cccggatcag ggcctggaat ggattggccg cattgatccc	240
tatgatagcg aaaccatta taaccagaaa tttaaagata aagcgattct gaccgtggat	300
aaaagcagca gcaccgcgta tatgcagctg agcagcctga ccagcgaaga tagcgcggtg	360
tattattgcy cgcgcggcaa ctgggatgat tattggggcc agggcaccac cctgaccgtg	420
agcagcggcg gcggcggcag cggcggcggc ggcagcggcg gcggcggcag cgatgtgca	480
attaccaga gcccgagcta tctggcggcg agcccggcg aaaccattac cattaactgc	540
cgcgcgagca aaagcattag caaagatctg gcgtggtatc aggaaaaacc gggcaaaacc	600
aacaaactgc tgatttatag cggcagcacc ctgcagagcg gcattccgag ccgcttttagc	660
ggcagcggca gcggcaccga tttaccctg accattagca gcctggaacc ggaagatttt	720
gcgatgtatt attgccagca gcataacaaa tatccgtata cctttggcgg cggcaccaaa	780
ctggaataa aagagagcaa gtacggccct ccctgcccc cttgcctgc ccccgagttc	840
gagggcggac ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagcca aggacaccct gatgatcagc	900
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagatcc cgaggtccag	960
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa	1020
cagttcaara gcacctaccg ggtggtgtct gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg	1080
aacggcaaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaagggcc tgcccagcag catcgaaaag	1140
accatcagca agccaaggg ccagcctcgc gagcccagc tgtacaccct gcctccctcc	1200
caggaagaga tgaccaagaa ccagggtgtcc ctgacctgcc tgggaaggg cttctacccc	1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcctg agaacaacta caagaccacc	1320
cctcccgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gccggctgac cgtggacaag	1380

5

ES 2 747 099 T3

agccggtggc aggaaggcaa cgtcttttagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1440
 cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc ctgggcaaga tgttctgggt gctgggtggtg 1500
 gtgggcgggg tgctggcctg ctacagcctg ctgggtgacag tggccttcat catcttttgg 1560
 gtgcgagca agcggagcag agcggccac agcgactaca tgaacatgac cccagacgg 1620
 cctggcccca cccggaagca ctaccagccc tacgccccac ccagggactt tgccgcctac 1680
 cggtcggcg gagggcgggt gaagttcagc agaagcggc acgcccctgc ctaccagcag 1740
 ggccagaatc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagaa gggaaagagta cgacgtcctg 1800
 gataagcggg gaggcgggga cctgagatg ggcggaagc ctcggcgga gaacccccag 1860
 gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggcgg aggcctacag cgagatcggc 1920
 atgaagggcg agcggagggc gggcaagggc cacgacggcc tgtatcaggg cctgtccacc 1980
 gccaccaagg atacctaaga cgcctgcac atgcagggcc tgcccccaag g 2031

<210> 5

<211> 2052

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica codificante del constructo 32716CAR(S228P+L235E)

<400> 5

cgatcgcggc ggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacgggggtg 60
 gggcggaaag acgactaggg ggtctaagtc gaccacgtct cgccgggcct tgactttttt 120
 ggcccgcttt ggcactttta atcgacgttt cgctcgccga tataaaaatg gttgataaccg 180
 tacttgacc actttgtccg cggcccgttt tcgaaattta cctaccogac ctaattgtgg 240
 atatggccgc tttcgtggat atcgcgccta aaatttccgg cgaaacgcaa atcggacctt 300
 tggtcgcgct cgtggcgcac agacgtataa ttgctagact ttttgcttct atggcgctgg 360
 ataaaaacgc gcgcgtcgcc gccgatacta ggctacctaa taaccccggt cccgtggctg 420
 cactggcact cgtcgccgcc gccgcgctcg ccgcccgcgc cgtcgccgcc gccccgctcg 480
 ctataacacg actgggtctc gggcgcgctcg gaccgccact cggacccgggt cgcgcgctgg 540
 taatcgacgg cgcgctcgct ttcgcaccta ttgataaccgt tgtgaaata cgtaaccata 600
 gtcgtctttg gcccggtcgg cggctttgac gactaaatag cgcgctcgtt ggacctttcg 660
 ccgtaaggcc gcgcgaaatc gccgtcgccg tcggcgtggc taaaatggga ctggtaattg 720
 ggccaccttc gcctactaca ccgctggata ataacggtcg tctcgttgct tctaggcggc 780
 tgaaaccgc gcccggtggt tgacctgac tttctctcgt tcatgccggg agggacgggg 840
 ggaacgggac gggggctcaa gctcccgcct gggtcgcaca aggacaaggg ggggttcggg 900
 ttctgtggg actactagtc ggccgtgggg ctccactgga cgcaccacca cctgcaactcg 960

10

ES 2 747 099 T3

gtccttctag ggctccaggt caagttaacc atgcacctgc cgcaccttca cgtggtgcgg 1020
 ttctggttcg ggtctctcct tgtcaagttg tcgtggatgg cccaccacag acacgactgg 1080
 cacgacgtgg tcctgaccga cttgccgttt cttatgttca cgttccacag gttggtcccg 1140
 gacgggtcgt cgtagctttt ctggtagtcg ttccggttcc cggtcggagc gtcgggggtc 1200
 cacatgtggg acggagggag ggtccttctc tactggttct tggccacacag ggactggacg 1260
 gaccacttcc cgaagatggg gtcgctgtag cggcacctca ccctctcgtt gccggtcgga 1320
 ctcttgttga tgttctgggt gggagggcac gacctgtcgc tgccgtcga gaaggacatg 1380
 tcggccgact ggcacctgtt ctccggccacc gtccttccgt tgcagaaatc gacgtcgcac 1440
 tacgtgctcc gggacgtgtt ggtgatgtgg gtcttctcgg actcggacag ggaccggttc 1500
 tacaagacc acgaccacca ccaccgcc caccgaccga cgatgtcga cgaccactgt 1560
 caccggaagt agtagaaac ccacgcctcg ttcgcctcgt ctccgccggt tcgctgatg 1620
 tacttgact gggggtctgc cggaccggg tgggccttcg tgatggtcgg gatgccccgt 1680
 gggccctga aacggcggat ggcacggccg cctccgcc acttcaagtc gtcttcgcg 1740
 ctgccccgac ggatggtcgt cccggtctta gtcgacatgt tgctcgactt ggaccgctct 1800
 tcccttctca tgctgcagga cctattgcc tctccggccc tgggactcta cccgccgttc 1860
 ggagccgct tcttgggggt ccttcggac atattgcttg acgtcttct gttctaccgg 1920
 ctccgatgt cgctctagcc gtacttccc ctcgcctccg ccccgttccc ggtgctgccg 1980
 gacatagtcc cggacaggtg gcggtggttc ctatggatgc tgcgggacgt gtacgtccgg 2040
 gacgggggtt cc 2052

<210> 6

<211> 2031

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica codificante del constructo 26292CAR(S228P+L235E)

<400> 6

cgatcgcggc ggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacgggggtg 60
 gggcggaaaag acgactaggg ggtccacgtc gacgtcgtcg gcccgccct tgaccacgcg 120
 ggcccgct cgcacttga ctgcagctt cgctcgcga tatggaaatg gtcgataacc 180
 tacttgacc actttgtgc gggcctagtc ccggacctta cctaaccggc gtaactaggc 240
 atactatcgc tttgggtaat attggtcttt aaatttctat ttcgctaaga ctggcaccta 300
 ttttcgtcgt cgtggcgcac atacgtcgc tcgtcggact ggtcgttct atcgcgccac 360
 ataataacgc gcgcgccgtt gaccctacta ataaccgccg tcccgtggtg ggactggcac 420

10

ES 2 747 099 T3

tcgtcgccgc cgccgcccgc gccgcccgc ccgtcgccgc cgccgcccgc gctacacgtc 480
 taatgggtct cgggctcgat agaccgcccgc tcgggcccgc tttggtaatg gtaattgacg 540
 gcgcgctcgt tttcgtaatc gtttctagac cgcaccatag tcctttttgg cccgttttgg 600
 ttgtttgacg actaaatata gccgtcgtgg gacgtctcgc cgtaaggctc ggcgaaatcg 660
 ccgtcgccgt cgccgtggct aaaatgggac tggtaatcgt cggaccttgg ccttctaaaa 720
 cgctacataa taacggtcgt cgtattgttt atagggcatat ggaaaccgcc gccgtggttt 780
 gacctttaat ttctctcgtt catgcgggga gggacggggg gaacgggacg ggggctcaag 840
 ctcccgcctg ggtcgcaaaa ggacaagggg gggttcgggt tcctgtggga ctactagtcg 900
 gcctgggggc tccactggac gcaccaccac ctgcactcgg tccttctagg gctccaggtc 960
 aagttaacca tgcacctgcc gcaccttcac gtggtgcggt tctggttcgg gtctctcctt 1020
 gtcaagttgt cgtggatggc ccaccacaga cagcactggc acgacgtggt cctgaccgac 1080
 ttgccgtttc ttatgttcac gttccacagg ttgttcccgg acgggtcgtc gtagcttttc 1140
 tggtagtcgt tccggttccc ggtcggagcg ctccgggtcc acatgtggga cggagggagg 1200
 gtccttctct actggttctt ggtccacagg gactggacgg accacttccc gaagatgggg 1260
 tcgctgtagc ggcacctcac cctctcgttg ccggtcggac tcttgttgat gttctggtgg 1320
 ggagggcacg acctgtcgtt gccgtcgaag aaggacatgt cggccgactg gcacctgttc 1380
 tcggccaccg tccttccggt gcagaaatcg acgtcgcact acgtgctccg ggacgtggtg 1440
 gtgatgtggg tcttctcggg ctcggacagg gaccgttctt acaagacca cgaccaccac 1500
 caccgcccc acgaccggac gatgtcggac gaccactgtc accggaagta gtagaaaacc 1560
 cacgcctcgt tcgcctcgtc tccgcccgtg tcgctgatgt acttgtactg ggggtctgcc 1620
 ggaccggggg gggccttctg gatggtcggg atgcggggtg ggtccctgaa acggcggatg 1680
 gccaggccc ccccccca cttcaagtgc tcttcgcggc tgcggggacg gatggtcgtc 1740
 ccggtcttag tcgacatggt gctcgcactg gaccctctt cccttctcat gctgcaggac 1800
 ctattcgcct ctccggcctt gggactctac ccgcccgttc gagccgcctt cttgggggtc 1860
 cttccggaca tattgcttga cgtctttctg ttctaccggc tccggatgtc gctctagccg 1920
 tacttcccgc tcgcctccgc cccgttcccg gtgctgccgg acatagtccc ggacaggtgg 1980
 cgggtggttc tatggatgct gcgggacgtg tacgtccggg acgggggttc c 2031

<210> 7

<211> 2052

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica codificante del constructo 32716CAR(S228P+L235E+N297Q)

<400> 7

ES 2 747 099 T3

cgatcgcggc ggtggtacga cgacgaccac tggctggacg acgacacgct cgacgggggtg 60
 gggcggaag acgactaggg ggtctaagtc gaccacgtct cgccgggct tgaacttttt 120
 ggcccgcttt ggcactttta atcgacgttt cgctcgccga tataaaaatg gttgataccg 180
 tacttgaccc actttgtccg cggcccgctt tcgaaattta octaccogac ctaattgtgg 240
 atatggccgc tttcgtggat atcgcgcta aaatttccgg cgaaacgcaa atcggacctt 300
 tggctcgct cgtggcgcat agacgtataa ttgctagact ttttgcttct atggcgctgg 360
 ataaaaacgc gcgctcgcc gccgatacta ggctaccta taaccccggt cccgtggctg 420
 cactggcact cgtcgccgc gcccgctcg ccgcccgc cgctcgccgc gcccgctcg 480
 ctataacacg actgggtctc gggccgctcg gaccgccact cggaccgggt cgcgctgg 540
 taatcgacgg cgcgctcgct ttgcaccta ttgataccgt tgtggaata cgtaaccata 600
 gtctctttg gcccggtcgg cggctttgac gactaaatag cgcgctcgtt ggaccttctg 660
 ccgtaaggcc gcgcaaatc gccgctcgcc tcggcggtgc taaaatggga ctggtaatg 720
 ggccaccttc gcctactaca ccgctggata ataacggctc tctcgttct tctaggcggc 780
 tggaaaccgc gcccggtggt tgacctgac tttctctcgt tcatgccggg agggacgggg 840
 ggaacgggac gggggtcaa gctcccgcct gggtcgaca aggacaaggg ggggttcggg 900
 ttctgtggg actactagtc ggcctgggg ctccactgga cgcaccacca cctgcactcg 960
 gtccttctag ggctccaggt caagttaacc atgcacctgc cgcacctca cgtgttcggg 1020
 ttctggttcg ggtctctcct tgtcaagty tcgtggatgg cccaccacag acacgactgg 1080
 caagcgtgg tctgaccga cttgccgtt cttatgttca cgttccacag gttgttcccg 1140
 gacgggtcgt cgtagctttt ctggtagtcg ttccggttcc cggctcgagc gctcggggtc 1200
 cacatgtggg acggagggag ggtcctctc tactggttct tgggtccacag ggactggacg 1260
 gaccacttcc cgaagatggg gtcgctgtag cggcacctca ccctctcgtt gccggtcgga 1320
 ctcttgttga tgttctgggt gggagggcac gacctgtcgc tgccgtcga gaaggacatg 1380
 tcggccgact ggcacctgtt ctcggccacc gtccttccgt tgcaaaaac gacgtcgac 1440
 tacgtgctcc gggacgtgtt ggtgatgtgg gtccttctcg actcggacag ggacccttc 1500
 tacaagacc acgaccacca ccaccgccc cacgaccgga cgatgtcga cgaccactgt 1560
 caccggaagt agtagaaaac ccacgcctcg ttcgcctcgt ctcccggtt gtcgctgatg 1620
 tacttgact ggggtctcgc cggaccggg tgggccttcg tgatggtcgg gatcgggggt 1680
 gggccctga aacggcggat ggcagggcc cctccgccc acttcaagtc gtcttcgcg 1740
 ctgccccgac ggatggtcgt cccggtctta gtgacatgt tgctcgaact ggaccctct 1800
 tcccttctca tgctgcagga cctattcgc tctccggccc tgggactcta cccgcccgtc 1860
 ggagccgcct tcttgggggt ccttccggac atattgcttg acgtcttct gttctaccgg 1920
 ctccgatgt cgtctagcc gtacttccc ctcgcctcc cccggtccc ggtgctgccc 1980
 gacatagtcc cggacaggtg gcggtggttc ctatggatgc tgcgggacgt gtacgtcccg 2040
 gacgggggtt cc 2052

<210> 8

<211> 2031

ES 2 747 099 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica codificante del constructo 26292CAR(S228P+L235E+N297Q)

5

<400> 8

cgatcgcggc ggtggtacga cgacgaccac tggtcggacg acgacacgct cgacgggggtg	60
gggcggaag acgactaggg ggtccacgtc gacgtcgtcg gcccgcgct tgaccacgcg	120
ggcccgcgct cgcactttga ctcgacgttt cgctcgccga tatggaaatg gtcgataacc	180
tacttgacc actttgtcgc gggcctagtc cgggacctta cctaaccggc gtaactaggc	240
atactatcgc tttgggtaat attggtcttt aaatttctat ttcgctaaga ctggcaccta	300
ttttcgtcgt cgtggcgcac atacgtcgac togtcggact ggtcgttct atcgcgccac	360
ataataacgc gcgcgccgtt gacctacta ataaccccg tcccgtggtg ggactggcac	420
tcgtcgccgc cgccgccgtc gccgccgccg ccgtcgccgc cgccgccgtc gctacacgtc	480
taatgggtct cgggctcgat agaccgccgc tcgggcccgc tttggtaatg gtaattgacg	540
gcgcgctcgt tttcgtaatc gtttctagac cgcaccatag tcctttttgg ccggttttg	600
ttggttgacg actaaatata gccgtcgtgg gacgtctcgc cgtaaggctc ggcgaaatcg	660
ccgtcgccgt cgccgtggct aaaatgggac tggtaatcgt cggaccttgg ccttctaaaa	720
cgctacataa taacggtcgt cgtattgttt ataggcatat ggaaaccgcc gccgtggttt	780
gacctttaat ttctctcgtt catgccggga gggacggggg gaacgggacg ggggctcaag	840
ctcccgctg ggtcgcaaaa ggacaagggg gggttcgggt tcctgtggga ctactagtcg	900
gcctgggggc tccactggac gcaccaccac ctgcactcgg tccttctagg gctccaggtc	960
aagttaacca tgcacctgcc gcaccttcac gtgttgccgt tctggttcgg gtctctcctt	1020
gtcaagttyt cgtggatggc ccaccacaga cacgactggc acgacgtggt cctgaccgac	1080
ttgccgtttc ttatgttcac gttccacagg ttgttcccgg acgggtcgtc gtagcttttc	1140
tggtagtcgt tccggttccc ggtcggagcg ctccgggtcc acatgtggga cggagggagg	1200
gtccttctct actggttctt ggtccacagg gactggacgg accacttccc gaagatgggg	1260
tcgctgtagc ggcacctcac cctctcgttg ccggtcggac tcttgttgat gttctggtg	1320

ES 2 747 099 T3

ggagggcagc acctgtcgtt gccgtcgaag aaggacatgt cggccgactg gcacctgttc 1380
 tcggccaccg tccttcctgt gcagaaatcg acgtcgcact acgtgctccg ggacgtgttg 1440
 gtgatgtggg tcttctcggg ctcggacagg gacccttctt acaagacca cgaccaccac 1500
 caccgcccc acgaccggac gatgtcggac gaccactgtc accggaagta gtagaaaacc 1560
 caagcctcgt tcgcctcgtc tccgcccgtg tcgctgatgt acttgactg ggggtctgcc 1620
 ggaccggggt gggccttcgt gatggtcggg atgcgggggtg ggtccctgaa acggcggatg 1680
 gccaggccgc ctcccgccca cttcaagtcg tcttcgcggc tcgggggacg gatggtcgtc 1740
 ccggtccttag tcgacatggt gctcgcactg gaccctctt cccttctcat gctgcaggac 1800
 ctattcgcct ctccggccct gggactctac ccgcccgtcg gagccgcctt cttgggggtc 1860
 cttccggaca tattgcttga cgtctttctg ttctaccggc tccggatgtc gctctagccg 1920
 tacttcccgc tcgcctccgc cccgttcccg gtgctgccgg acatagtccc ggacaggtgg 1980
 cgggtggtcc tatggatgct gcgggacgtg tacgtccggg acgggggttc c 2031

<210> 9

<211> 679

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del constructo 32716CAR(S228P+L235E)

<400> 9

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
 20 25 30

Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45

Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
 50 55 60

Lys Ser Phe Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser
 65 70 75 80

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

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp
 100 105 110

10

ES 2 747 099 T3

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp
 115 120 125

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

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

Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile
 165 170 175

Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met
 180 185 190

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 195 200 205

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 210 215 220

Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp
 225 230 235 240

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr
 245 250 255

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 260 265 270

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
 275 280 285

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 290 295 300

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 305 310 315 320

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 325 330 335

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 340 345 350

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 355 360 365

ES 2 747 099 T3

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 370 375 380

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 405 410 415

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 420 425 430

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 450 455 460

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met
 485 490 495

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 500 505 510

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
 515 520 525

Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
 530 535 540

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
 545 550 555 560

Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 565 570 575

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 580 585 590

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 595 600 605

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly

ES 2 747 099 T3

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

ES 2 747 099 T3

<211> 679

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de aminoácidos del constructo 32716CAR(S228P+L235E+N297Q)

<400> 11

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
20 25 30

Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Ser Phe Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser
65 70 75 80

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

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp
100 105 110

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp
115 120 125

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

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

Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile
165 170 175

Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met

ES 2 747 099 T3

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
450 455 460

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met
485 490 495

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
500 505 510

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
515 520 525

Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
530 535 540

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
545 550 555 560

Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
565 570 575

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
580 585 590

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
595 600 605

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
610 615 620

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
625 630 635 640

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

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

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675

<210> 12

<211> 672

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos del constructo 26292CAR(S228P+L235E+N297Q)

ES 2 747 099 T3

<400> 12

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu
20 25 30

Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp
50 55 60

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

His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys
85 90 95

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

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160

Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg
165 170 175

Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro
180 185 190

Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
195 200 205

ES 2 747 099 T3

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 210 215 220

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys
 225 230 235 240

Gln Gln His Asn Lys Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 245 250 255

Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 260 265 270

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 275 280 285

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 290 295 300

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 305 310 315 320

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 325 330 335

Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 340 345 350

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 355 360 365

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 385 390 395 400

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 405 410 415

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 420 425 430

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 435 440 445

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 450 455 460

ES 2 747 099 T3

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
465 470 475 480

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu Val Val Val
485 490 495

Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile
500 505 510

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

Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln
530 535 540

Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly
545 550 555 560

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
565 570 575

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
580 585 590

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
595 600 605

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
610 615 620

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
625 630 635 640

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
645 650 655

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
660 665 670

<210> 13

<211> 229

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

ES 2 747 099 T3

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

REIVINDICACIONES

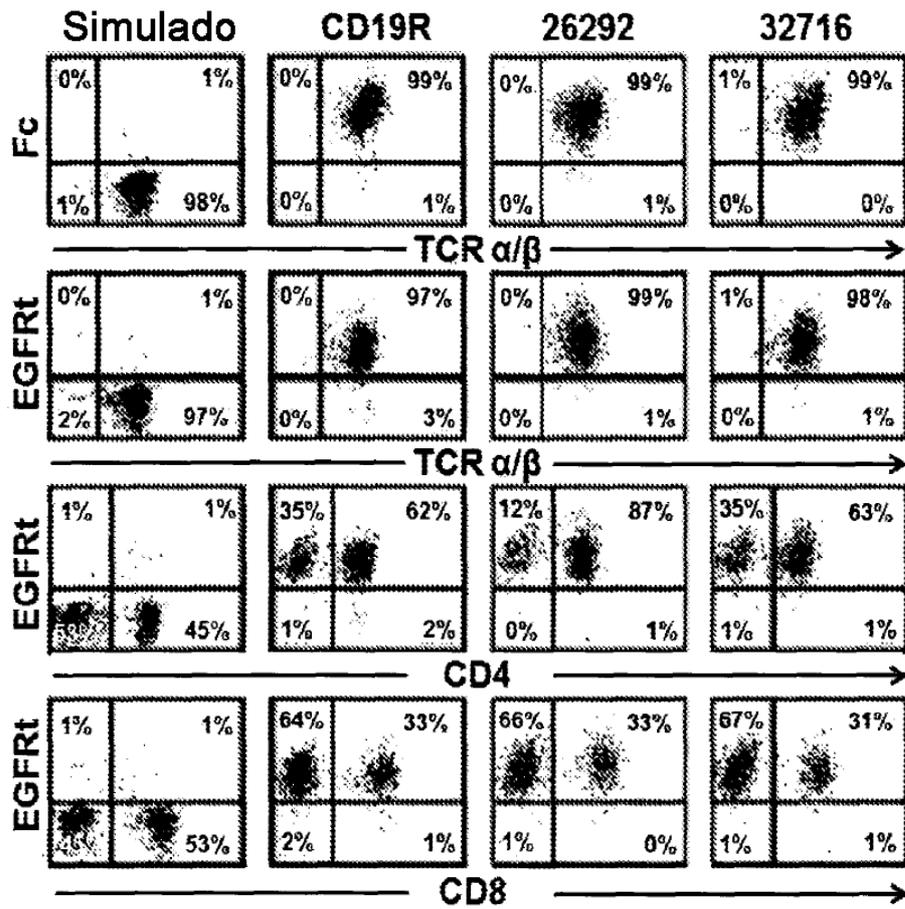
1. Un gen del receptor de antígeno quimérico de CD123 (CD123CAR), que comprende una región de scFv anti-CD123 fusionada en el marco a una región bisagra de IgG4 modificada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una sustitución de aminoácidos S228P y una sustitución de aminoácidos L235E; y
- 5 un dominio de señalización de cadena zeta de un receptor de células T (TCR), en el que la región bisagra de IgG4 modificada comprende además una secuencia nucleotídica que codifica una sustitución N297Q.
2. El gen de CD123CAR de la reivindicación 1, en el que la región de scFv anti-CD123 codifica un dominio VH y un dominio VL de la inmunotoxina recombinante 26292 o 32716.
3. El gen de CD123CAR de la reivindicación 1, en el que la región de scFv anti-CD123 está humanizada.
- 10 4. El gen de CD123CAR de la reivindicación 1, que comprende además al menos un dominio de señalización coestimulante seleccionado de un dominio de señalización coestimulante de CD27, un dominio de señalización coestimulante de CD28, un dominio de señalización coestimulante de 4-1BB, un dominio de señalización coestimulante de OX40, o cualquier combinación de los mismos.
- 15 5. El gen de CD123CAR de la reivindicación 1, que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4.
6. El gen de CD123CAR de la reivindicación 1, en el que el gen codifica una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.
7. El gen de CD123CAR de la reivindicación 1, en el que el gen es parte de un casete de expresión que se inserta en un vector vírico.
- 20 8. El gen de CD123CAR de la reivindicación 7, en el que el casete de expresión comprende además un gen accesorio seleccionado de un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt), un gen de CD19 truncado (CD19t), o un gen de caspasa 9 inducido.

Fig. 1

A



B



C

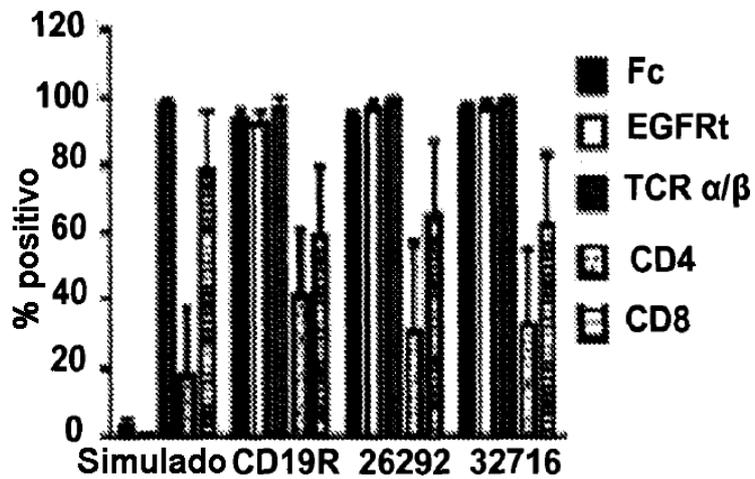


Fig. 2

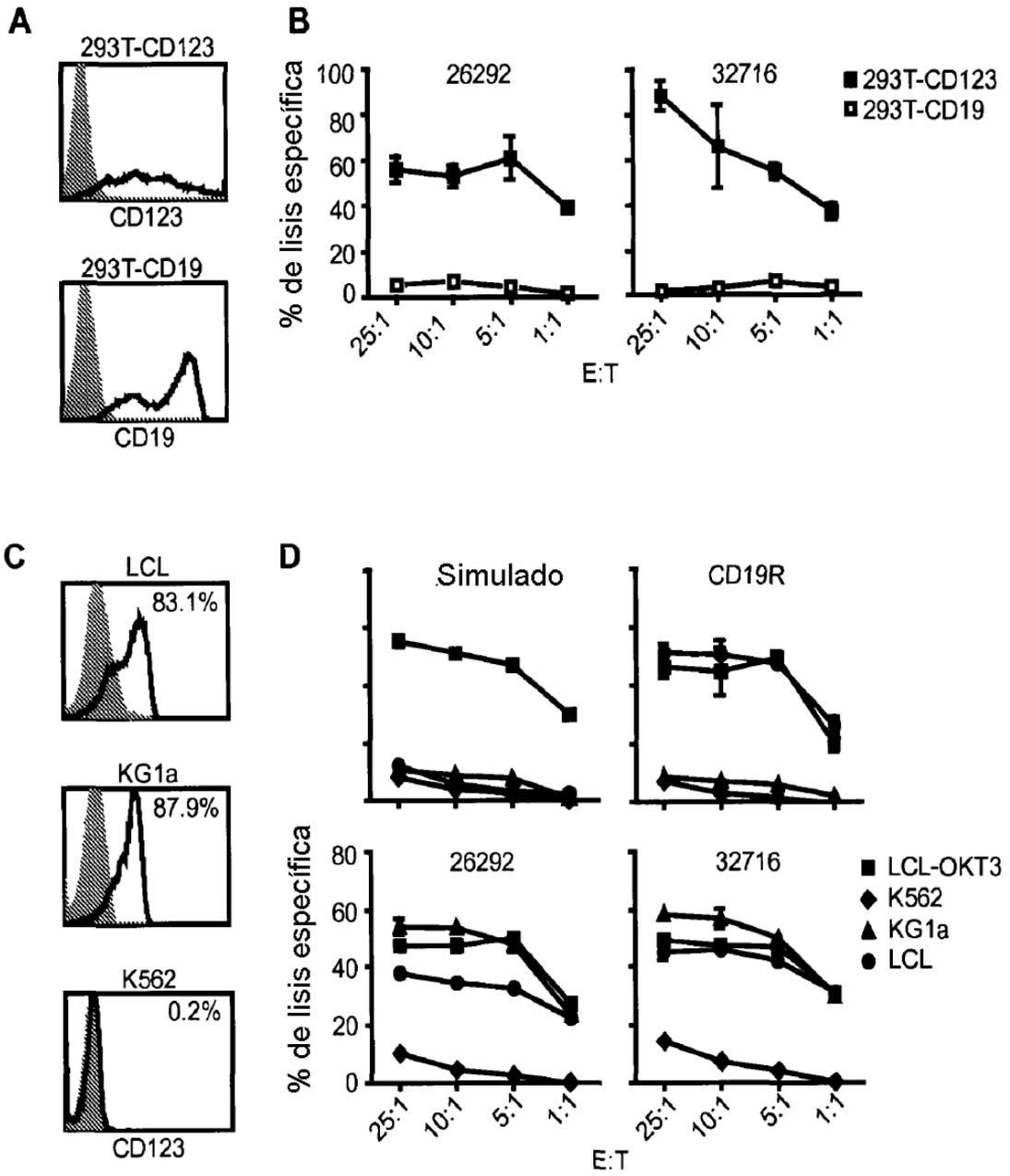


Fig. 3A

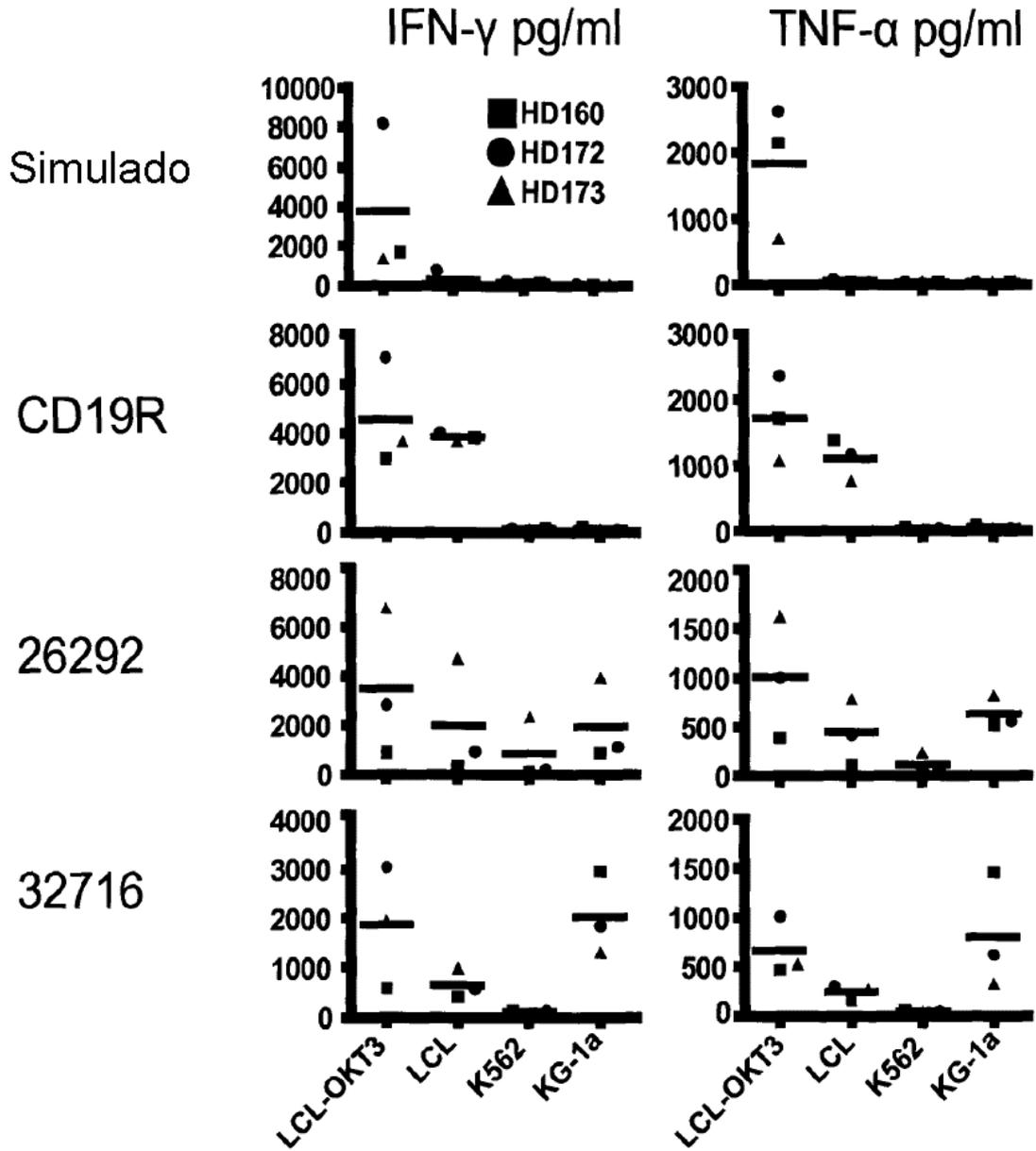


Fig. 3B

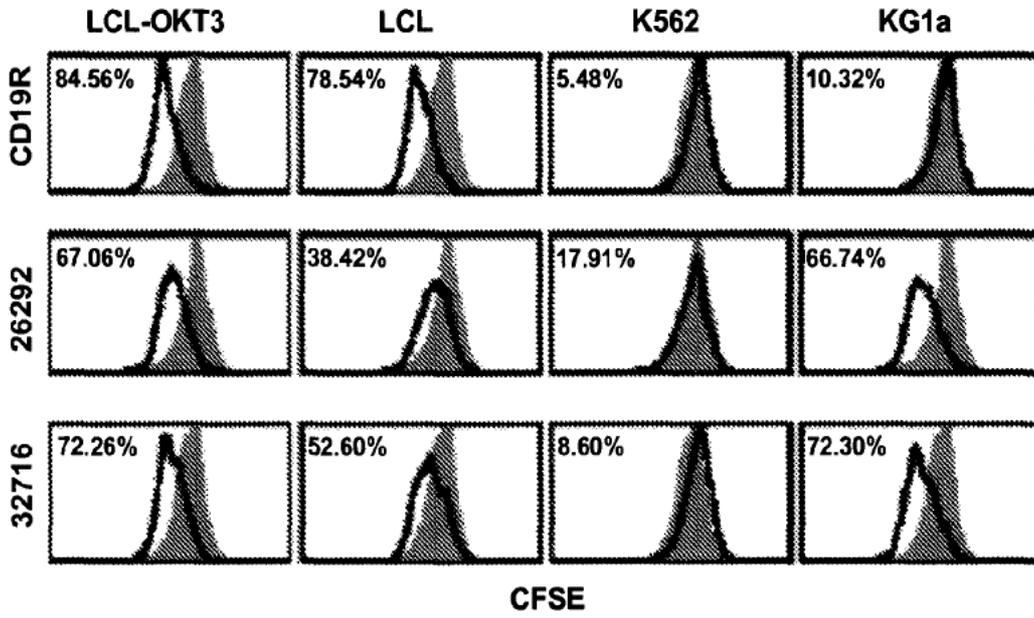
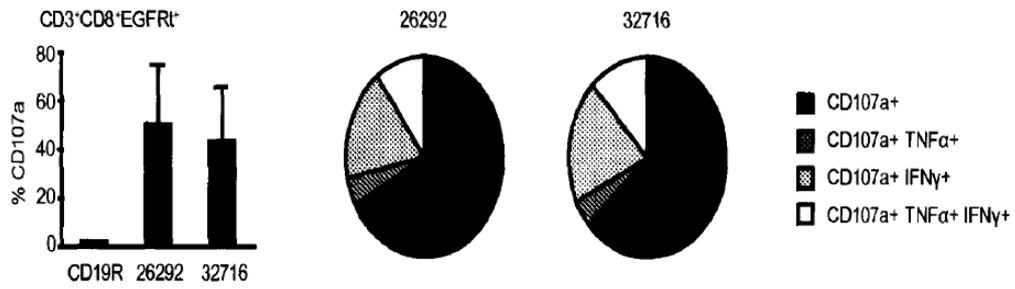


Fig. 4

A



B



C

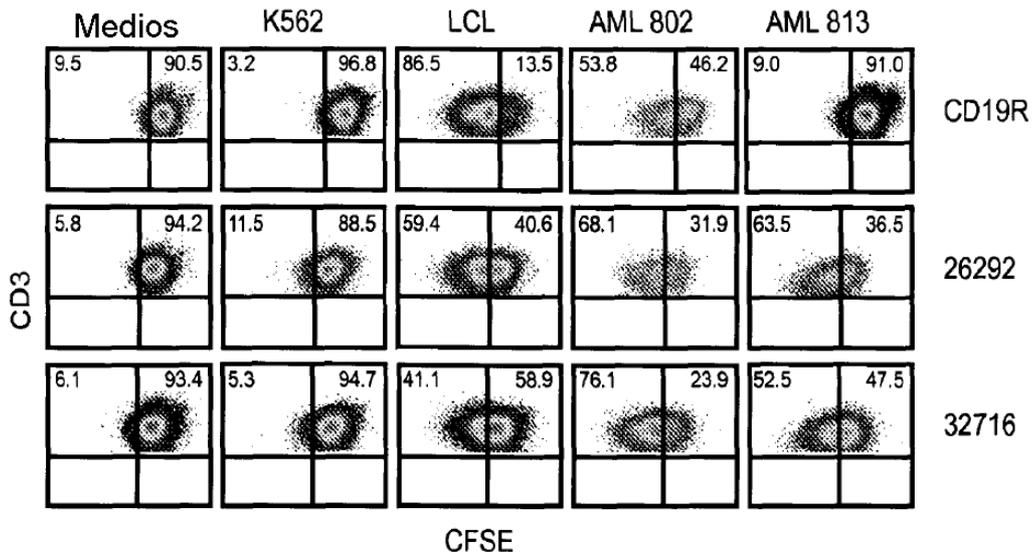


Fig. 5

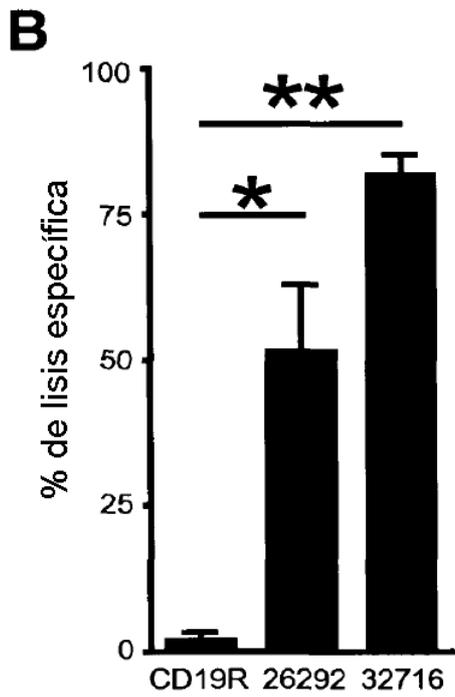
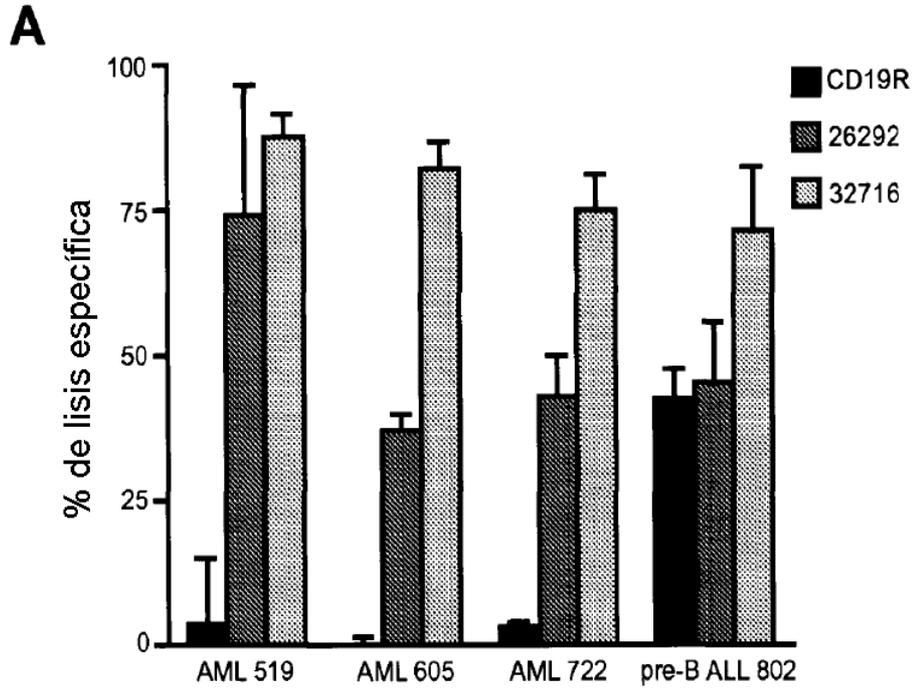


Fig. 6

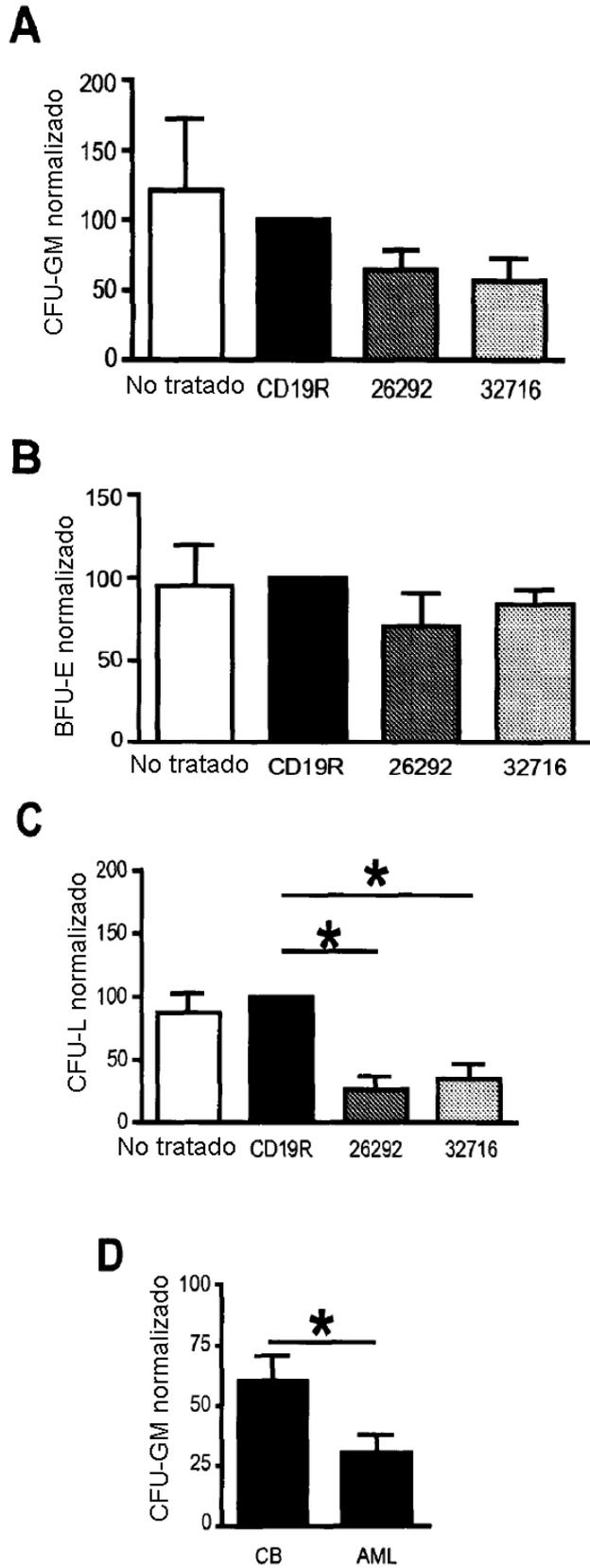


Fig. 7

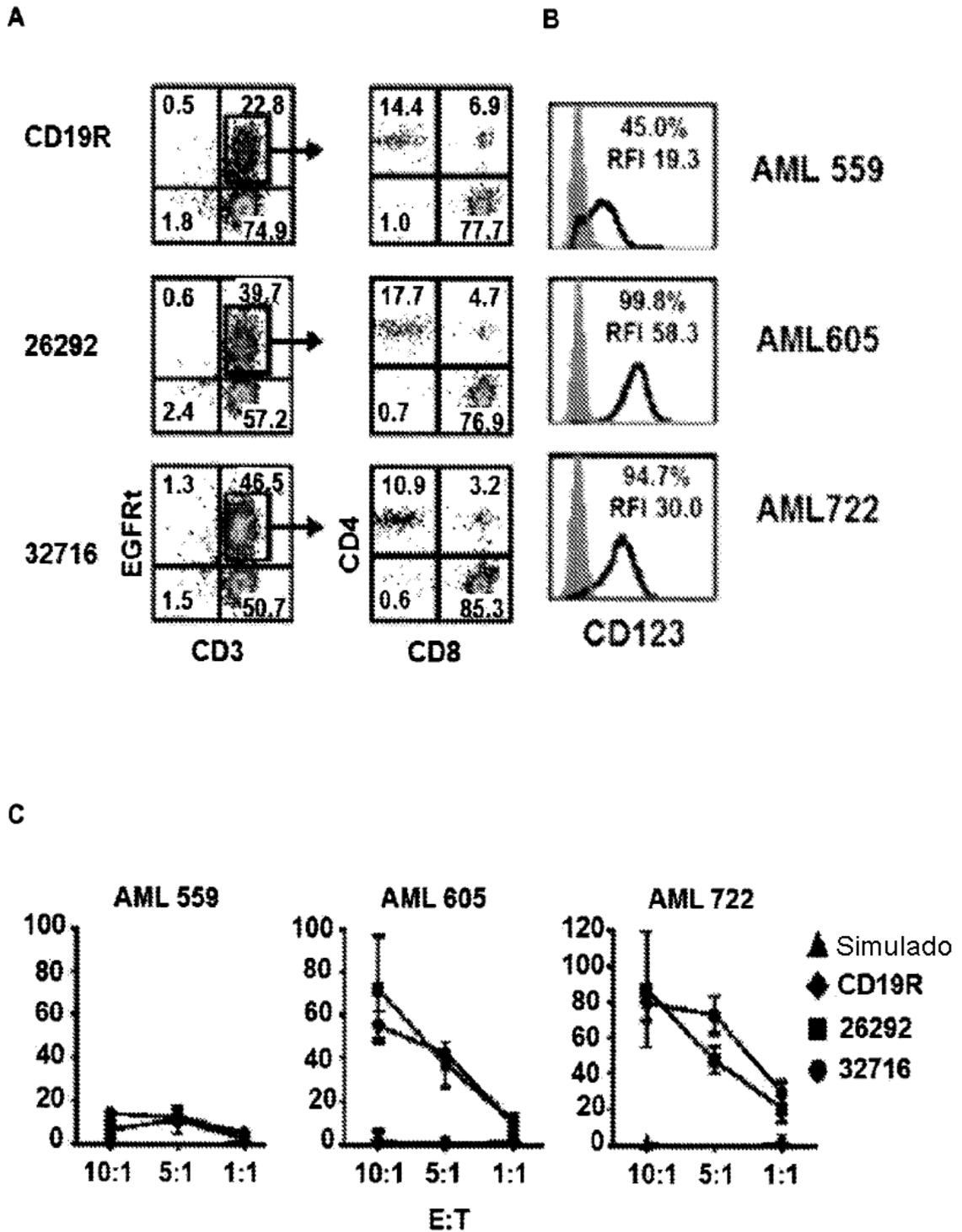


Fig. 8

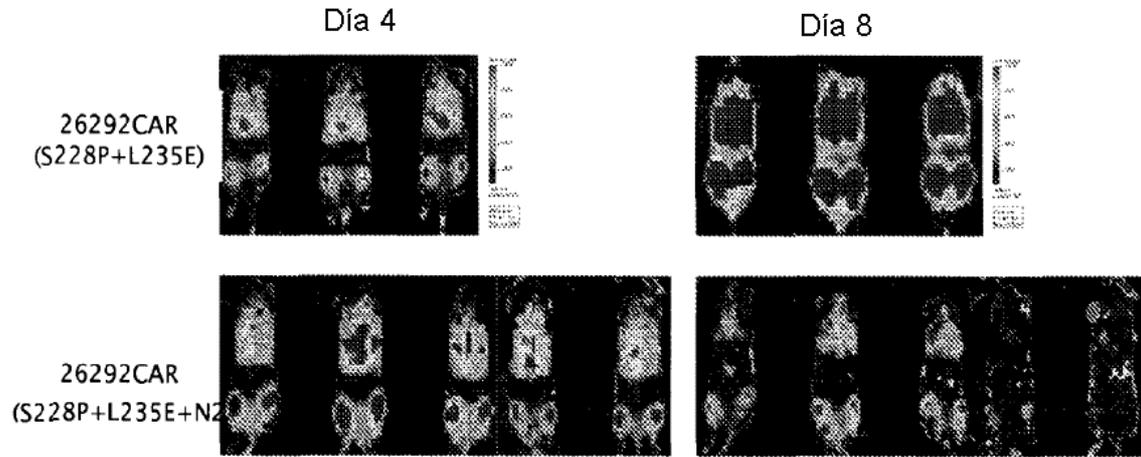


Fig. 9

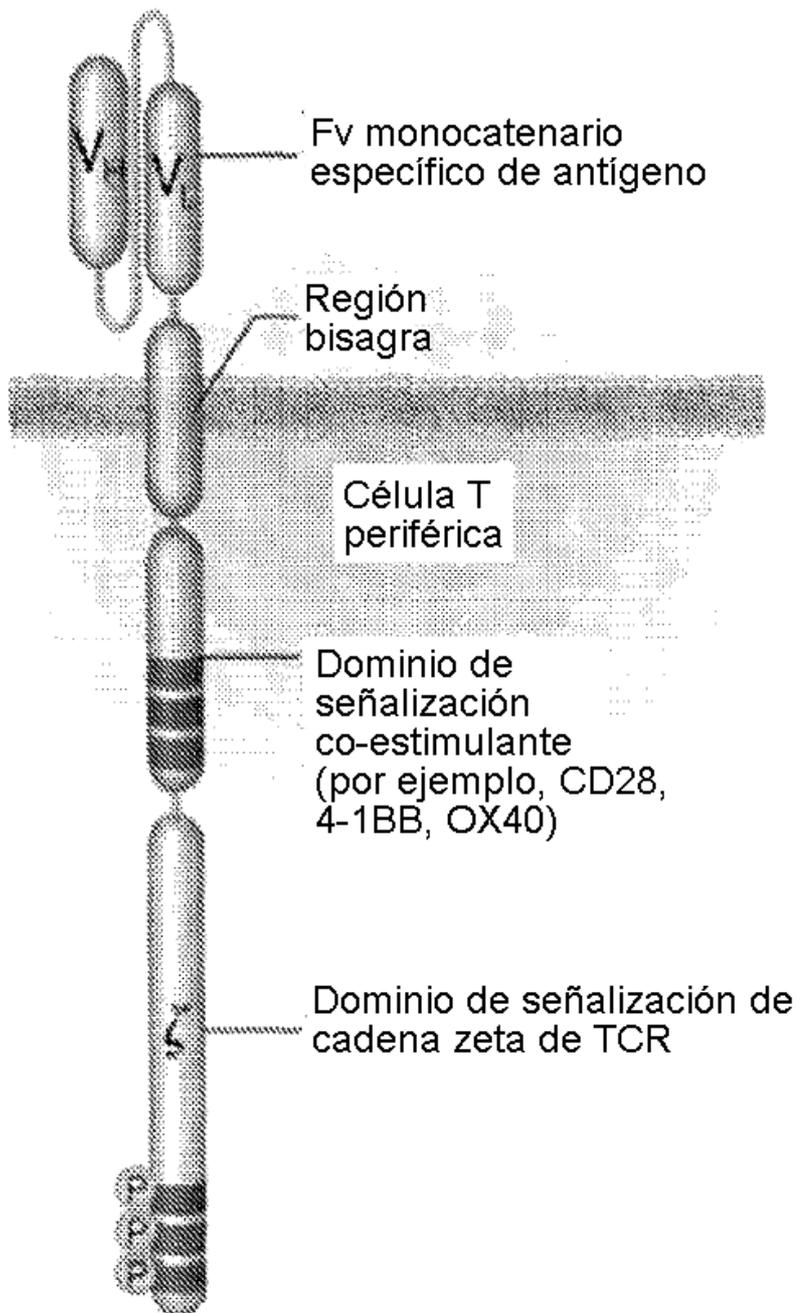
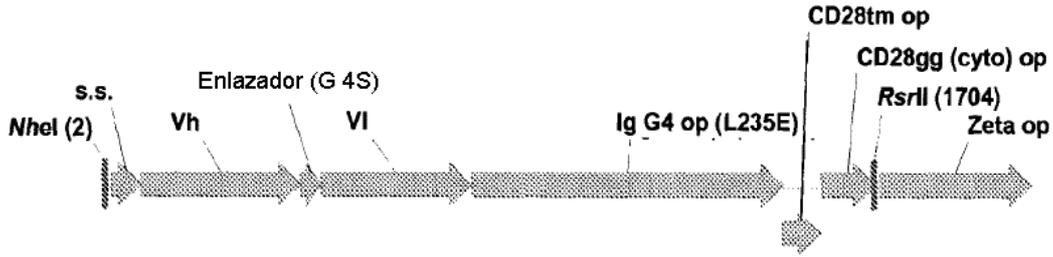


Fig. 10



IL3scfv-igG4(L235E)-CD28gg-Zeta (32716)- antes CO

2052 pb

NheI
↓~~~~~

Secuencia señal de GMCSFR alfa →

	M	L	L	L	V	T	S	L	L	L	C	E	L	P	H
1	GCTAGCGCCG	CCACCATGCT	GCTGCTGGTG	ACCAGCCTGC	TGCTGTGCGA	GCTGCCCCAC	CGATCGCGGC	GGTGGTACGA	CGACGACCAC	TGGTCGGACG	ACGACACGCT	CGACGGGGTG			

Vh (32716) →

	P	A	F	L	L	I	P	Q	I	Q	L	V	Q	S	G	P	E	L	K	K	
61	CCCGCCTTTC	TGCTGATCCC	CCAGATTCAG	CTGGTGCAGG	GCGGCCDGGG	ACTGAAAAAA	GGGCGGAAAG	ACGACTAGGG	GGTCTAAGTC	GACCACGTC	CGCCGGGCTT	TGACTTTTTT									
	P	G	E	T	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	I	F	T	N	Y	G	
121	CCGGGCGAAA	CCSIGAAAAT	TAGCTGCAAA	GCGAGCGGCT	ATATTTTTC	CAACTATGGC	GGCCCGCTTT	GGCACTTTTA	ATCGACGTTT	CGCTCGCCGG	TATAAAAATG	GTGGATACCG									
	M	N	W	V	K	Q	A	P	G	K	S	F	K	W	M	G	W	I	N	T	
181	ATGAACGGG	TGAAAAGAGC	GCCGGGCAAA	AGCTTAAAT	CGATGGGCTG	GATFAAAGCC	TCCTTGAGCC	ACTTTGTCGG	CGCCCGCTTT	TGGAAATTTA	CCTACCCGGC	CTAATTGTGG									
	Y	T	G	E	S	T	Y	S	A	D	F	K	G	R	F	A	F	S	L	E	
241	TATACCGGG	AAAGCACTA	TAGCGCGGAT	TTTAAAGGCC	GCTTTGCGTT	TAGCCTGGAA	ATAAGCGGCG	TTTCCTGGAT	ATCGCGCTA	AAATTTCCGG	CGAAACGGAA	ATCGCACTT									
	T	S	A	S	T	A	Y	L	H	I	N	D	L	K	N	E	D	T	A	T	
301	ACCAGCGCGA	GCACCGCTA	TCTGCATATT	AACGATCTGA	AAACGAAAGG	TACCGCGACC	TGGTCGCGCT	CGTCGGCGAT	AGACGATATA	TTGCTAGACT	TTTTGCTTCT	ATGCGCGCTGG									
	Y	F	C	A	R	S	G	G	Y	D	P	M	D	Y	W	G	Q	G	T	S	
361	TATTTTTCGG	CGCCAGCGG	CGGCTATGAT	CCGATGGATG	ATTGGGGGCA	GGGCACGAGC	ATAAAAAGGC	GCCCGTGGCC	GCCGATACIA	GGCTAAGCTAA	TAAACCCGGC	CCCGTGGTCC									

Enlazador G 4S →

	V	T	V	S	S	G	G	G	G	G	S	G	G	G	G	G	S	G	G	S	
421	GTGACCGTGA	GGAGGGGGGG	GGGCGGAGC	GGGCGGGGG	GGAGGGGGGG	GGGCGGAGC															

Vl (32716) →

	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	
481	GATATTTGTC	TGATCCAGAG	CCCGGGAGTC	CCGCGGGTGA	CCCTGGGCTG	GCAGCGGAGC	CTATAAACAG	ACGCGGCTTC	GGGCGGCTTC	GACCGTACT	CGGACCCGCT	CGGCGGCTTC									
	I	S	C	R	A	S	E	S	V	D	N	Y	G	N	T	F	M	H	W	Y	
541	ATTAGCTGGC	GCCGAGGGA	AAGCGTGGAT	ACTATGGG	ACACCTTTAT	GCATTCGTA	TATAGGAGG	CGGCTCGCT	TTGCGAGCTA	TTCATACGCT	TGTGAAATG	CGTAAAGATA									
	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	N	L	E	S	
601	CAGCAAAAG	CGGCGCAGC	GCCGAACTG	CGCATTTATC	GCCGAGCTGA	CCCTGAAAGC	GTGGCTTTTG	CCCGGCTTGG	CGGCTTTGAC	GATTAAGTAG	CGCGCTTCTT	GGACCTTTCC									
	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	R	T	D	F	T	L	T	I	N	
661	GGCATTCGGG	CCGCTTTTAS	CGGCAAGGTC	AGCGCGACCG	ATTTTACTCT	GGCCTTTAAC	CCGTAAAGGC	GCCCGAATG	GCCGTTCCCG	TCCGCTTGGC	TAAAGTGGGA	CTGTTAATTC									

Fig. 10 (cont.)

P V E A D D V A T Y Y C Q Q S N E D P P
 721 CCGGTGGGAG CCGATGATGT GGCGACCFAT TATTGCCAGC AGAGGAAAGG AGATCCCGCG
 GGCACDCTTC GCGTACACCA CCGTGGGATG ARAADGDTG TCTCGTGGCT TCTAGGKGGC

IgG4op (L235E) →

T F G A G T K L E L K E S K Y G P P C P
 781 ACCTTTGGCG CCGGACGAA ACGTGGACTG AAAGAGAGCA AGTACGGCCC TCCCTGCCCC
 TGGAAADGTC GCGCGTGGTT TCACTTGGAC TTTCTCTCGT TCATGCCGGG AGGGACGGGG
P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P

841 CCTTGGCCCTG CCCCGAGTT CGAGGGCGGA CCCAGCGTGT TCCTGTTCOC CCCCAAGCCC
 GGAACGGGAC GGGGGCTCAA GCTCCCGCCT GGTTCGCACA AGGACAAGGG GGGGTTCGGG
 K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S

901 AAGGACACCC TGATGATCAG CCGGACCCCC GAGGTGACCT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC
 TTCTGTGGG ACTACTAGTC GCGCTGGGGG CTCCACTGGA CGCACCACCA CCTGCCTCG
 Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A

961 CAGGAAGATC CCGAGGTCCA GTTCAATTGG TACGTGGAGC GCGTGGAGT GCACAAGGCC
 GTCCTTCTAG GGCTCCAGGT CAAGTTAACC ATGCACCTGC CGCACCTTCA CGTGTTCGGG
 K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T

1021 AAGACCAAGC CCAGAGAGGA ACAGTTCAAC AGCACCTAOC GGGTGGTGTG TGTCCTGACC
 TTCTGGTTCG GGTCTCTCCT TGTCAAGTTG TCGTGGATGG CCCACCACAG ACACGACTGG
 V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G

1081 GTGCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAA GAATACAAGT GCAAGSTGTG CAACAAGGCC
 CAGGACSTGG TCCTGACCGA CTTGCCGTTT CTTATGTTCA CGTTCACAG GTTGTTCOCG
 L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q

1141 CTGCCCAGCA GCATCGAAAA GACCATCAGC AAGGCCAAGG GCCASCTTCG CGAGCCCCAG
 GACGGSTCGT CGTAGCTTTT CTGGTAGTCG TTCCGCTTCC CCGTGGGACC GCTCGGGGTC
 V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C

1201 GTGTACACCC TGCCCTCCCTC CCAGGAAGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGTG CCTGACCTGC
 CACATGTGGG ACGGAGGGAG GGTCCCTTCTC TACTGGTTCF TGGTCCACAG GGACTGGAGC
 L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P

1261 CTGGTGAAGG GCTTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA CGGCCAGCCT
 GACCACTTCC CGAAGATGGG GTGCTGTGTAG CCGCACCTCA CCCTCTCGTT GCGGTCGGGA
 E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y

1321 GAGAACAACF ACAAGACCAC CCGTCCCGTG CTGGACAGCG ACGGCAGCTT CTTCTGTIAC
 CTCTTGTGTA TGTTCTGGTG GGGAGGGCAC GACCTGTTCG TGCCGTCGAA GAAGGACATG
 S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V

1381 AGCCGGCTGA CCGTGGACAA GAGCCGGTGG CAGGAAGGCA ACGTCTTTAG CTGCAGCGTG
 TCGGCCGACT GGCACCTGTT CTCGGCCACC GTCCTTCCGT TGCAGAAATC GACGTCCGAC
 M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K

1441 ATGCACGAGG CCGTGCACAA CCACTACACC CAGAAGAGCC TGAGCCCTGT CCGGGCAAG
 TACGTGCTCC GGGACGTGTT GGTGATGTGG GTCTTCTCGG ACTCGGACAG GGACCCGTTG

CD28tm op →

M F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T
 1501 AIGTTCGTGG TCGTGGTGGT GGTGGGGGGG GTGCTGGGCT GGTACAGCTT GCTGGTGGCA
 TACAGAGCCG ACGACCGGCA CCACCCCGCC CAGACCTGGG CGATGTCGGA CGACCACTGT

CD28gg (cyto) op →

V A F I I F W V R S K R S R **G G** H S D Y
 1561 GCGGCTTCA TCACTTTTGG GGTGGGAAAC AAGCGGAGCT GAGTGGGGLK CAGGACATAC
 CAGCGGAGCT AGTAAAGAAC CCACCTTTCG TTTGDTTAGE CTGCGTGGGT STACTGTGTC
 M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P

1621 AATGACATGK CCGGACGAGC GGTGAGGAGG ACGGAGAGCT ACTAGCAGCC CTGAGGAGCA
 KALISTACT GCGGCTTTCG CCGACCGGGG TGGACCTTCC TGAAGTTCAG GATGTCGGGI

Fig. 10 (cont.)

RsrII

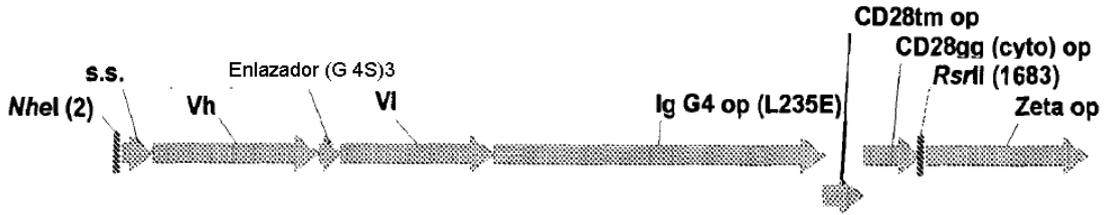
~~~~~↓

Zeta op→

```

1681 P R D F A A Y R S G G G R V K F S R S A
      GCGGAGGAGG TCCCGGCTTA CCAATTA GGC GGAGGGGGGG TGAAGTCCCA CAGAAGCGCC
      GCGGAGGAGG TCCCGGCTTA CCAATTA GGC GGAGGGGGGG TGAAGTCCCA CAGAAGCGCC
      D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R
1741 GACGCGCGCG CCAACGACCA GGGCGGCAAT GAGGCTGACA ACGAGCTGAA CCTGGGCGAA
      CTGCGCGCGC GCAATGCTGT CCGGGCTTAA GTGACATGTA TGCTGCTT GGCCTGCTT
      R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K
1801 AAGGAAGAGC ACGAGTCTCT GGAATAGCGG AGAGGCGGG ACGCTGAGAT GCGCGGCGAG
      TCCCTTCTCA TCGTGCAGGA CCAATTCGCC TCTCGCGCGC TGGGACTGTA CCGCGGCTTC
      P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A
1861 CCGCGGCGGA AGAAGCGGCA GAAAGCGCTG TATGAGGAA TCGAGGAAAA CAGGATCGCC
      GAGCCGCCC TCTGCGGGT CCTGCGGAG ATATGCTTG AATCTTTT GTCCTGCGG
      E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G
1921 GACGCGCGCG CCAACGACCA CATTGAGCG GAGCGGAGG GCGGGAAGGG CCAAGGAGGC
      CTGCGCGCGC GCAATGCTGT GTACTTCCCG CTGCGGCTCG CCGCTTCT CCGTCTGCGG
      L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A
1981 CTGATGCGG GCTGCTCAC CGCCACCAAG GATGCTTACG ACGGCTGCA CAGCGGCGCC
      GACGAGTCT CCGGACAGTG CCGCTGCTTC CATTGCTAG TCGCGGAGCT GATGCTGCGG
      L P P R
2041 CCGCGGCGGA GG
      GACGCGCGCG CC
  
```

Fig. 11



**IL3scfv-IgG4(L235E)-CD28gg-Zeta (26292)**  
2031 pb

NheI  
↓

Seuencia señal de GMCSFR alfa →  
M L L L V T S L L L C E L P H

1. GCTAGCGCCG CCACCATGCT GCTGCTGGTG ACCAGCCTGC TGCTGTGCGA GCTGCCCCAC  
CGATCGCGGC GGTGGTACGA CGACCACCAC TGGTCGGAAG ACCACACGCT CGAOCGGGGT

**Vh (26292) →**

61 P A F L L I P Q V Q L Q Q P G A E L V R  
CCCCCTTTC TGCTGATCCC CCAGGTGCAG CTGCAGCAGC CCGGCGCGGA ACTGGTGGGC  
GGGCGGAAAG ACGACTAGGG GGTCCACGTC GACGTGTGTG GCGCGCGCT TACCCACGGC  
P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y W  
121 CCGGCGCGGA GCGTGAACCT GAGCTGCAAA GCGAGTGGCT ATACCTTTAC CAGCTATTGG  
GGCCCGCGCT GGCATTTTGA CTCGACGTTT CGCTCCCGCA TATGAAATG GTCGATTAAC  
M N W V K Q R P D Q G L E W I G R I D P  
181 ATGACTGGG TGAACAGCG CCGGATCAG GCGCTGGAT GATTGGCCG CATTGATCCG  
TACTTGACCC ACTTGTGCG GGGCCTAGTC CCGGACCTE CCTAACCGCC GTAACGAGGC  
Y D S E T H Y N Q K F K D K A I L T V D  
241 TATGATAGCG AAACCCATTA TAACCGAAA TTTAAAGAA AAGCGATTCT GACCGTGGAT  
ATACATGCG TTTCGGAAAT ATTGCTCTTT AAATTTCTAT TTCCTAAGA CTGGACCTTA  
K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V  
301 AAAAGCAGA GCACCGGTA TATGACGCTG AGCAGGCTGA CCAGCGAAGA TAGCGCGGTG  
TTTTCGTCCT GGTGCGCAT ATACGTCGAC TCGTCGGACT GGTGCTTCT ATCGCGGAC  
Y Y C A R G N W D D Y W G Q G T T L T V  
361 TATTATTCGG CCGCGCGCA CTCGGATGAT TATTGGGGCC AGGGCACCAC CCGGACGCTG  
ATAATAACGC GCGCGCGCTT GACCTACTA ATAACCCCG TCCCGTGGT GACCTGGCAC

**Enlazador G4S →** **Vl**

**(26292) →**

421 S S G G G G S G G G G S G G G G G S D V Q  
AGCAGGCGG GCGCGCGCG CCGCGCGCG GCGAGGCGG GCGCGCGCG CAGTGTGCG  
TGGTGGCGG CCGCGCGCG GCGCGCGCG CCGTGGCGG CCGCGCGCG GCTAGCGCG  
I T Q S P S Y L A A S P G E T I T I N C  
481 ATTACCCAGA GCGGAGCTA TCTGGTGGG AGCCCGGGG AAACATATAC CATTACTGCG  
TATGGGCTC CCGGTGTGAT AGACCGCGG TCGCGCGCG TTGGTAAATG GTAGTGGAGC  
R A S K S I S K D L A W Y Q E K P G K T  
541 CCGCGCGCG AAACCATTA CCAAGATCT CCGTGGTAT AGGAAAAAC GGGCBAACG  
GCGCGGTGT TTTCGGAAAT GTTTGTAGAC CGCAGCATAG TCTTTTTCG CCGTGTTCG  
N K L L I Y S G S T L Q S G I P S R F S  
601 AACAACTGCG TCGTGTATG CCGGAGCGC CTGCAGTATG GCGTTCGCG CCGTGTTCG  
TTTGTTCAGC ACTAAATAT CCGCGCGCG GACGTCGCG CCGTGTTCG GCGGAAATG  
G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F  
661 GCGCGCGGA GCGGACCGA TTTTACCGT ACCATAGCA CCGTGGAAAC GCAAGATTTT  
CGGTGCGCG CCGCGCGCTT AAATGGGAC TCGTAAATCG CCGGACCTGG CCGTGTTCG  
A M Y Y C Q Q H N K Y P Y T F G G G T K  
721 GCGTGTATG ATTGCGCGA GCGTACAAA TATCGTATG CCGTGGCGG CCGGACCGCA  
CGCTAGATAA TACTGGCGT GATATTTTTC AAAGGATAT GCAACCGCG CCGTGTTCG

Fig. 11 (cont.)

**IgG4op (L235E) →**

781 L E I K E S K Y G P P C P P C P A P E F  
 CTGCAATTA AAGGAGCCA GTTCCTTC (CGCAGGCA) GAGACCAAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GACTTTTAA TTTTCTTCTT (GAGGAGGCA) GAGACCAAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**E G G P S V F L F P P K P K D T L M I S**

841 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GTTCCTTC GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q**

901 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E**

961 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L**

1021 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K**

1081 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S**

1141 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P**

1201 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T**

1261 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K**

1321 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N**

1381 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**H Y T Q K S L S L S L G K M F W V L V V**

**CD28tm op→**

1441 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W**

1501 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**C A C C C G C C C A C G A C C G G A C G A T G T G G A C G A C C G G A G T A G T A G A A A A C C**

**CD28gg (cyto) op→**

1561 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**V R S K R S R G G H S D Y M N M T P R R**

1621 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y**

1681 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**R S G G G R V K F S R S A D A P A Y Q Q**

**Zeta op→**

1681 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
 GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG  
**G C C A G G C C G C T C C C G C C A C T C A A G T C G T C T P P P C G C T G C G G G G A C G G A T G G T C G T C**

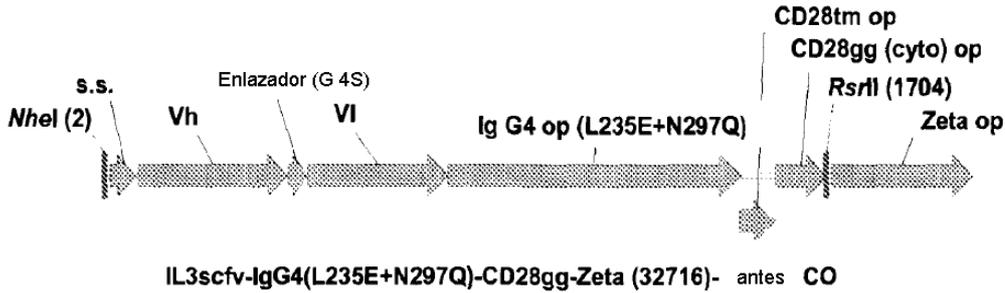
RsrII  
 ~~~~~↓

Fig. 11 (cont.)

```

      G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L
1741 GGCACAGATC AGCTGTACAA CGAGCTGAAC CTGGGCAGAA GGAAGAGTA CGAGTCTCTG
      COGGTCTTAG TCGACATGTT GCTCGACTTG GACCCGTCCT CCGTTCTCAT GCTGCAGGAC
      D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q
1801 GATAAGCGGA GAGGCGGGA CCTGAGATG GCGGCAAGC CTGGGAGAA GAACCCCGAG
      CTATTGCGCT CTCGGGCGCT GAGACTTAC CGGCGCTCG GAGCCGCGCT CTTCGGGGTC
      E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G
1861 GAGGCGCTGT ATACGACT GCAGAAAGAC AAGATGGCC AGGCTACAG CGAGATCGGC
      CTTCGGACA TATTGCTTGA CGTCTTCTG TTCTACCGGC TCGGATGTC GCTCTAGCG
      M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T
1921 ATGAGGGGG AGCGGAGGG GGCAGGGCC CACGAGGGC TGTATCAGG CCGTCTCCAC
      TACTTCCCGC TCGGCTCCGC CCGTTCGGC GTGCTCCCG ACATAGTCC GGACAGGTGG
      A T K D T Y D A L H M Q A L P P R
1981 GGCACCAAGG ATACTACGA CGCCCTGAC ATGCAAGGCC TCGGCGAAG G
      CCGTCTCC CATTGGATGCT GCGGACGTC TACCTCCGG ACGGGCGTTC C
    
```

Fig. 12



IL3scfv-IgG4(L235E+N297Q)-CD28gg-Zeta (32716)- antes CO

2052 pb

NheI
↓~~~~~

Secuencia señal de GMCSFR alfa →

M L L L V T S L L L C E L P H

1 GCTAGCGCCG CCACCATGCT GCTGCTGGTG ACCAGCCTGC TGCTGTGGGA GCTGCCCCAC
CGATCGCGGC GGTGGTAGCA CGACGACCAC TGGTCCGACG ACGACACGCT CGACGGGGTG

Vh (32716)→

61 P A F L L I P Q I Q L V Q S G P E L K K
CCGCGCTTTC TGCTGATCCC CCAGATTCAG CTGGTCCAGA GCGGCCCCGA ACTGAAAAAA
GGGCGGAAAG ACGACTAGGG GGTOTAAGTC GACCACTGT CTCCGGGGCT TGACTTTTTT
P G E T V K I S C K A S G Y I F T N Y G
121 CCGGGGAAAA CCGTGAATA TAGCTGCAAA GCGAGCGGCT ATATTTTTC CAACTATGGC
GGCGCGCTTT GGCATTTTA ATCGACGTTT CGCTCCCGCA TATAAAAATG GTTGAATCCG
M N W V K Q A P G K S F K W M G W I N T
181 ATGACACGGG TGAAACAGGC GCGGGGCAAA AGCTTAAAT GGATGGGGTG GATTAACACC
TACTTGAKCC ACTTTGTCCG GCGCCGTTT TCGAAATTTA CTTACCCGAC CTAATTCGGG
Y T G E S T Y S A D F K G R F A F S L E
241 TATACCGGG AAAGCACTA TAGCGCGGAT TTTAAAGGCC GCTTTGGCT TAGCGCGAA
AAATGGGCGG TTTCCGGGAT ATCGCGCTA AATTTCCCG CGAAACGCA ATCGGACCTT
T S A S T A Y L H I N D L K N E D T A T
301 ACCAGCGGGA GCACCGGTA TCTGCATATT AACGATCTGA AAAACGAAAG TACCGCGACC
TGGTCCGCTT CCGTGGGCAAT AGACGATAA TTGCTAGACT TTTTCTTCT ATGGCGGCTG
Y F C A R S G G Y D P M D Y W G Q G T S
361 TATTTTTCG CCGGACGGG CGGCTATGAT CCGATGGATT ATTGGGGCCA GGGCACCAAT
ATAAAAAAGC GCGCGTGGC GCGGATGCTA GGTACTCTAA TAACCCCGGT CCGGTGGTCG

Enlazador G4S→

421 V T V S S G G G G G S G G G G S G G G G S
GTGACCGTGA GAGCGGGCG CCGCGGAGC GCGCGCGCG GAGCGGGCG CCGCGGAGC
CACTGGCACT CGCGCGGCG CCGCGGTCG CCGCGGCGC GCGCGGCGC CCGCGGTCG

Vl (32716)→

481 D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T
GATTTTTCG TAACTCGAG CCGCGGAGC CTGGCGGTA GCTTGGGCA GCGCGGAGC
CTATAACCG ACTGCTGTC GCGCGGTCG GAGCGGCACT CCGAGCGGCT CCGCGGTCG
I S C R A S E S V D N Y G N T F M H W Y
541 ATTAGCTGCC GCGCGGCGA AAGCGTGGAT AACTATGGCA ACACCTTTAT GCGTGGGAT
TAACTGAGG CCGCGGTCG TTTGCACTA TCGATACCTT TGTGCAATA CTTAAKATL
Q Q K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S
601 CAGCGAAAC CCGCGGAGC GCGGAAACT CCGATTTAT GCGCGGCA CCGCGGAGC
GCGGCTTTC GCGCGGTCG CCGCTTTTC GACTAAATAG CCGCGGCTT GCGCGGTCG
G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N
661 GCGTTCGCA CCGCTTTTC CCGCGGAGC AGCGGACCG ATTTTACCT GCGGATTA
CCTAAGGCG CCGCGGAGC GCGGTCGCT TCGCGGTCG TAAATGCGA CCGGATTTG

Fig. 12 (cont.)

P V E A D D V A T Y Y C Q Q S N E D P P
 721 CCGGTGCAAG CCGATGATGT GGGKACCEAT TATTGKCBGC AGAGDAAQGA AGMKKCGCGG
 GGCADQDTTC GCGTACBAQA CDGCTGGAIE AEAADQDTTC TCTGCTGGCT TDTAGGCGGC

IgG4op (L235E+NJ297Q) →

T F G A G T K L E L K E S K Y G P P C P
 781 ACGTTEGGCG CCGFDACAA ACCKGMACTG AAAGAGAGCA AGTACGGCCC TCCCTGCCCC
 FGGADADQGC GCCCGEGGTY TACCTTGAC TTCTCTGCT TCATGCCGGG AGGGACGGGG
P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P
 841 CCTTGDCCTG CCCCCAGTT CGAGGGCGGA CCCAGGCTGT TCCTGFTCC CCCCAGGCC
 GGAACGGGAC GGGGGCTCAA GCTCCCGCCT GGGTCCGACA AGGACAAGGG GGGGTTCCGG
 K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
 901 AAGGACACCC TGATGATCAG CCGGACCCCC GAGGTGACCT GCGTGGTGGT GGAOCTGAGC
 TTCTGTGGG ACTACTAGTC GGCCTGGGGG CTCCACTGGA CGCACCACCA CCTGCACCTG
 Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A
 961 CAGGAAGATC CCGAGGTCCA GTTCAAITGG TACGTGGACG GCGTGGAACT GCACAACGCC
 GTCTTTTAG GGCTCCAGGT CAAGTTAACC ATGCACCTGC CGCACCTTCA CGTGTTCGGG
 K T K P R E E Q F Q S T Y R V V S V L T
 1021 AAGACCAGC CCAGAGAGGA ACAGTCCAR AGCACCTACC GGGTGGGTC TGTGCTGACC
 TTCTGGTTCG GGTCTCTCCT TGTCAGGTY TCGTGGATGG CCCACCACAG ACACGACTGG
 V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G
 1081 GTGCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAA GAATACAAGT GCAAGGTGTC CAACAAGGGC
 CACGAGGEGG TCCTGACCGA CTTGCCGTTT CTTATGTECA CGTTCCACAG GTTGTTCGGG
 L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q
 1141 CTGCCACGA GCATCGAAAA GACCAFCAGC AAGGCCAAGG GCCAGCCTCG CGAGCCCCAG
 GACCGGTCTT CGTAGCTTTT CTGGTAGTCG TTCCGCTCC CGGTCCGACG GCTCGGGTTC
 V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C
 1201 GTGTACACCC TGCTCCCTC CCAGGAAGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGTC CCTGACCTGC
 CACATGTGGG ACGGAGGGAG GGTCTCTCTC TACTGGTCT TGGTCCACAG GGACTGGAGG
 L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P
 1261 CTGGTGAAGG GCTTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA CGGCCAGCCT
 GACCACTTCC CGAAGATGGG GTCCCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCCTT GCCGGTCCGA
 E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y
 1321 GAGAACAAC ACAAAGACCAC CCGTCCCGTG CTGGACASCG ACGGCAGCTT CTTCTGTAC
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG GGGAGGGCAC GACCTGTCTG TGCCGTGGA GAAGGACATG
 S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V
 1381 AGCCGGCTGA CCGTGGACAA GAGCCGGTGG CAGGAAGGCA ACGTCTTCTAG CTGCAGCGTG
 TCGGCCACT GGCACCTGTT CTCGGCCACC GTCTTCCGT TGCAGAAATC GACGTCCGAC
 M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K
 1441 ATGCACGAGG CCCTGCACAA CCACTACACC CAGAAGAGCC TGAGCCTGTC CCTGGGCAAG
 TACGTGCTCC GGGACGCTT GGTGATGTGG GTCTTCTCGG ACTCGGACAG GGACCCGTT

CD28tm op →

M F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T
 1501 AIGTEKFGGG TCGTGGEGGT GGTGGGGGGS GTCCTGGGCT GTTACAGCTT GCTGGTGGCA
 TACAAGAKK AGLACADCA CCACCCGCC CAGCAAGGS CGAGTGGGA CGACCACTGG

CD28gg (cyto) op →

V A F I I F W V R S K R S R **G G** H S D Y
 1561 GTGGCCTTA TATCTTTTGG GGTGGGTAAC AAGCGLACG GAGGAGAAK CAGCGACTAC
 CACCGGAAGT AGTAGAAAC CCACGCTTCC TTGCTGAAE CTCCGCTGGT STAGTGTATG
 M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P
 1621 ATGAAKAAV CCGCGAAAG GCTGAAKAG ACGCGGAGC ACAGCGAGC CTACGACAA
 EACHTGCTT GGGGCTGCT CCGGCGGAG GGGGCTTTC TGLTGGGGA GATGCGGAG

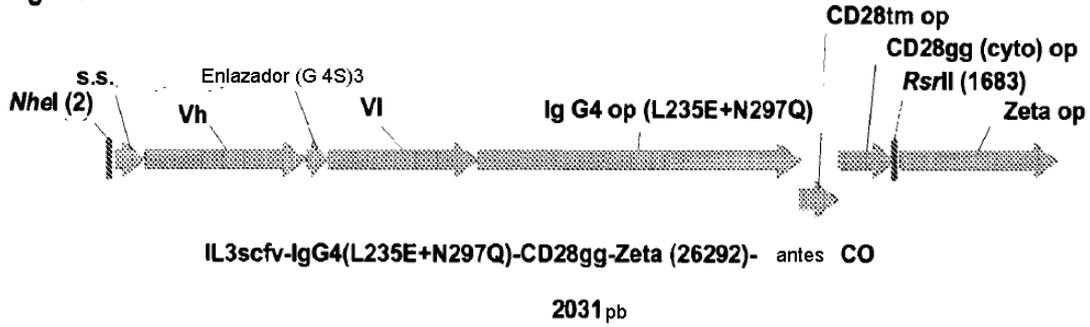
Fig. 12 (cont.)

```

                                RsrII
                                ~~~~~↓
                                Zeta op→
P R D F A A Y R S G G G R V K F S R S A
1681 GCGGAGAAAT TCGGAGATA GAAATLGGC GGAGGGGGG TGAAGTTGAG CAGAAAGGCC
GAGTCCCTG GAGGAAAT GCGGAGCCG CCTCCCGCC ACTTGAAGTC GCTTTGAGG
D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R
1741 GCGGCCCCG GATAGACCA GGGGAGAAAT CACCTGACAA ACGAGCTGAA CCGGAGGAA
GTCGAGGAGC GATAGTCTT CCGGAGCA GTCGACAGG TCGTGAATTT GAGTCCGCT
R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K
1801 AGGGAGAGC AGGAGTCTT GAAAGAGG GAGGAGGGG AGCTTGAAT GGGGAGGAG
TCCCTTCTCA TCGTGGGGA GATATGCGC TCGGAGGAG TGGGAGTCA GGGGAGGTC
P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A
1861 CCGGAGGGA GAGGAGGCA GAAAGGCTG TATAGTAA GCGGAGGCA GAAAGGAGG
GAGGAGGCT TTTGAGGCT CCTGAGGAG ATATGCTG AGTCTTTCT GTCGAGGAG
E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G
1921 GAGGAGTCA GAGAGATGG CATGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG CAGGAGGAG
GCGGAGGAG GCGGAGGAG GATATGCGC GTCGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG
L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A
1981 GGTATCAGG GCTGTCAG CAGGAGGAG GATAGTCA GCGGAGGAG CAGGAGGAG
GATAGTCA GCGGAGGAG GATATGCGC GATAGTCA TCGGAGGAG GATAGTCA
L P P R
2041 GCGGAGGAG GCGGAGGAG
GAGGAGGAG GCGGAGGAG

```

Fig. 13



NheI
↓~~~~~

Seuencia señal de GMCSFR alfa →
M L L L V T S L L L C E L P H

1 GCTAGCGCCG CCACCATGCT GCTGCTGGTG ACCAGCCTGC TGCTGTGGGA GGTGCCCCAC
CGATCGCGGC GGTGGTACGA CGACGACCAC TGGTCGGACG ACGACACGCT CGACGGGGTG

Vh (26292) →

61 P A F L L I P Q V Q L Q Q P G A E L V R
CCCGCCTTTC TGCTGATCCC CAGGGTGCAG CTGCACGAGC GGGGCTGGGA ACTGGTGGGC
GGCGGGAAG ACGACTAGGG GGTCCACGTC GAGCTGTGCG GCGCGGCGCT TGAACACGGC
P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y W

121 CCGGGGCGCA GCGTGAAACT GAGCTGCAAA GCGAGCGGCT ATACCTTTAC CAGCTATTGG
GGCCCGCGCT CGCACTTTGA CTCGACGTTT CGCTCGCCGA TATGGAAATG GTCGATAACC
M N W V K Q R P D Q G L E W I G R I D P

181 ATGAACGGG TGAACACGGC CCGGATCAG GGCCTGGAAT GGATTGGCCG CATTGATCCG
TACTTGACCC ACTTTGTGCG GGCCTAGTC CCGGACCTTA CCTAACCGGC GTAACATAGG
Y D S E T H Y N Q K F K D K A I L T V D

241 TATGATAGCG AAACCCATTA TAACCAGAAA TTTAAAGATA AAGCGATTCT GACCGTGGAT
ATACTATCCG TTTGGGTAAT ATTGGTCTTT AAATTTCTAT TTCGCTAAGA CTGGCCACTA
K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V

301 AAAAGCAGCA GCACCGCGTA TATGCAGCTG AGCAGCCTGA CCAGCGAAGA TAGCGCGCAT
TTTTCTGTCG CGTGGCGCAT ATACGTCGAC TCGTGGGACT GGTGCTTTCT ATCGCGCCAC
Y Y C A R G N W D D Y W G Q G T T L T V

361 TATTATTGCG CGCGCGCAA CTGGGATGAT TATTGGGGCC AGGGCACAC CCTGACCGTG
ATAATAACGC GCGCGCGTT GACCCACTA ATAACCCCGG TCCCGTGGTG GGACTGGCAC

Enlazador G4S → **Vl**

(26292) →

421 S S G G G G S G G G G S G G G G G S D V Q
AGCAGCGGCG GCGGCGGCG GCGGCGGCG GGCAGCGGCG GCGGCGGCG CATGTCGACG
TCGTGCGCGC GCGGCGGCG GCGGCGGCG GCGGCGGCG GCGGCGGCG GCTACAGCTC
I T Q S P S Y L A A S P G E T I T I N C

481 ATACCCAGA GCGGAGCTA TCTGGGCGCG AGCCCGCGCG AAGCTATEAC CATTACTGCG
TAATGGGCTC GCGGCTGAT AGACCGCGCG TCGGCGGCG TTTGGTAAAG GATATGAGCG
R A S K S I S K D L A W Y Q E K P G K T

541 CCGGCGGCG AAGCATTAG CAAAGATCTG GGTGCGGCTC AGGAAAAAC GGGCAAAAC
GCGGCTGCTT TTTCCGATC GTTGTAGAC CCGACATAG TCTTTTTCG GCGGTTTTCG
N K L L I Y S G S T L Q S G I P S R F S

601 AAGAACTTC TGAATTTAG CAGGAGCTC CTGCATAGCG GCTTTCGCG CAGTTTTCG
TGTTTGAGC ACTAAATATC GCGGCTGCTG GAGCTGCGCG CAGTAAAGCT GCGGAAATTC
G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F

661 GCGGCGGCG GCGGAGCTA TTTAAGCTG ACCATAGCA GCGGCAACG GGAAGATTT
GCGGCGGCTC GCGGCTGCT AAAATGGGAC TGTAAATGCG CCGACCTTTC CTTTCAAAA
A M Y Y C Q Q H N K Y P Y T F G G G T K

721 GCGATGATC ATTGATAGC GCAATACAA TATCGTATA CTTTGGCGCG CCGGACCAA
CGCTACATAA TAACCGCGCT CATATTGTTT AAGGCTATAT GGAACCCCG GCGGCTGCTT

Fig. 13 (cont.)

IgG4op (L235E) →

L E I K E S K Y G P P C P **E** C P A P E F
 781 CTGGAAATTA AAGAGAGGAA TTAGAGKCCY CCGTGGAAAG CTGGCCCTGT CAAAGAGGTC
 GAGCTTTAAT TTCTCTGIII CATGCTGGGA GAGAGAGGAG GAGCTGGAGC GGGTTCTAGG
E G G P S V F L F P P K P K D T L M I S
 841 GCGGAGGAGG CCGAGGAGG GCTTCTTTTC CCGAGAGGAA AGGAGAGG GATGATTTAC
 CTGCTGCTTG GATGAGGAAA GAGAGAGGAG GGGTTCGGGT TCGTGTGGAA CAGAGAGGAG
 R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q
 901 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG CCGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
 961 TTGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 Q F **Q** S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
 1021 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K
 1081 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
 1141 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
 1201 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
 1261 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K
 1321 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N
 1381 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG

CD28tm op→

H Y T Q K S L S L S L G K M F W V L V V
 1441 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W
 1501 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG

CD28gg (cyto) op→

V R S K R S R **G** G H S D Y M N M T P R R
 1561 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y
 1621 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG
 RsrII
 ~~~~~↓  

**Zeta op→**

R S G G G R V K F S R S A D A P A Y Q Q  
 1681 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG  
 GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG GAGAGAGGAG

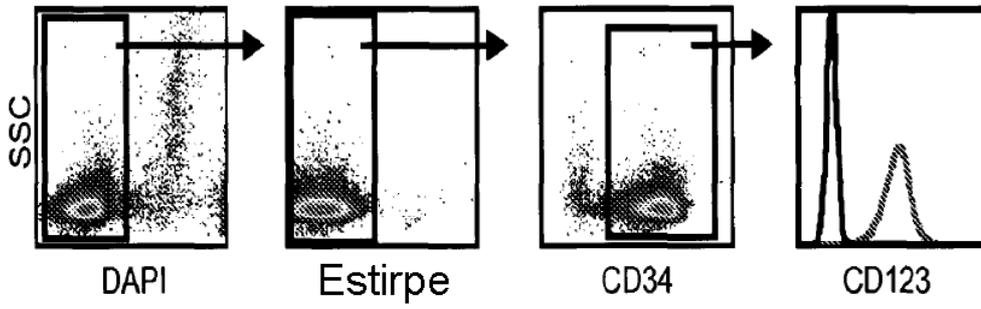
Fig. 13 (cont.)

```

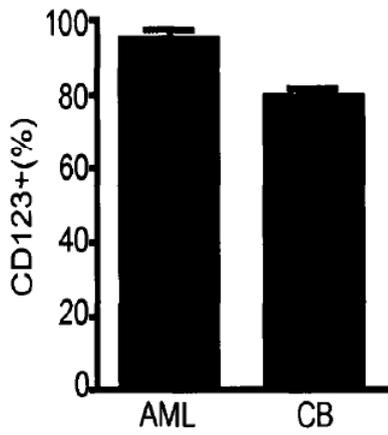
      G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L
1741  GGGCAGAATC AGCTGTACAA CGAGCTGAAC CTGGGCAGAA GGGAAAGAGTA CGAAGTCTTG
      CCGGTCTTAG TGACATGTT GCTCGACTTG GACCCGTCCT CCCTTCTCAT GCTCGAGGAC
      D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q
1801  GATAAGCGGA GAGGCGGGGA CCTTGAGATG GCGGCAAGC CTGGGCGGAA GAACCCCGAG
      CTATTGGGCT CTCCGGCCCT GGGACTCTAC CCGCCTTTCG GAGCCGCTTT CTGGGGGTC
      E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G
1861  GAGGCGCTGT ATACGAACT GCAGAAAGAC AAGATGGCCG AGGCCTACAG CGAGATCGGC
      CTTCGGGACA TATTGCTTGA CGTCTTTCTG TTCTACCGCG TCGGATGTC GCTGTAGGCG
      M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T
1921  ATGAAGGGGG AGCGGAGCGG GGGCAAGGGC CACGACGGGG TGTATCAGGG CCGTCCACC
      TACTTCCCGC TCGCTCCCG CCGTTCCTCG GTCTCCCGG ACATAGTCC GGACAGGTCG
      A T K D T Y D A L H M Q A L P P R
1981  GGCACCAAGG ATACCTACGA CGCCCTGCAC ATGCAGGCCC TGCCCCCAAG G
      CCGTGGTTCC TATGGATGCT GGGGACGCG TACGTCCGGG ACGGGGGTTC C
    
```

Fig. 14

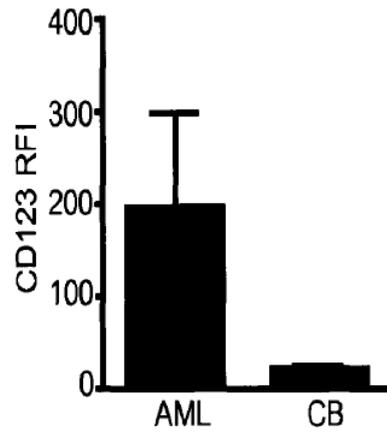
**A**



**B**



**C**



**D**

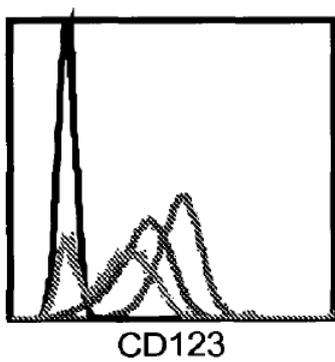
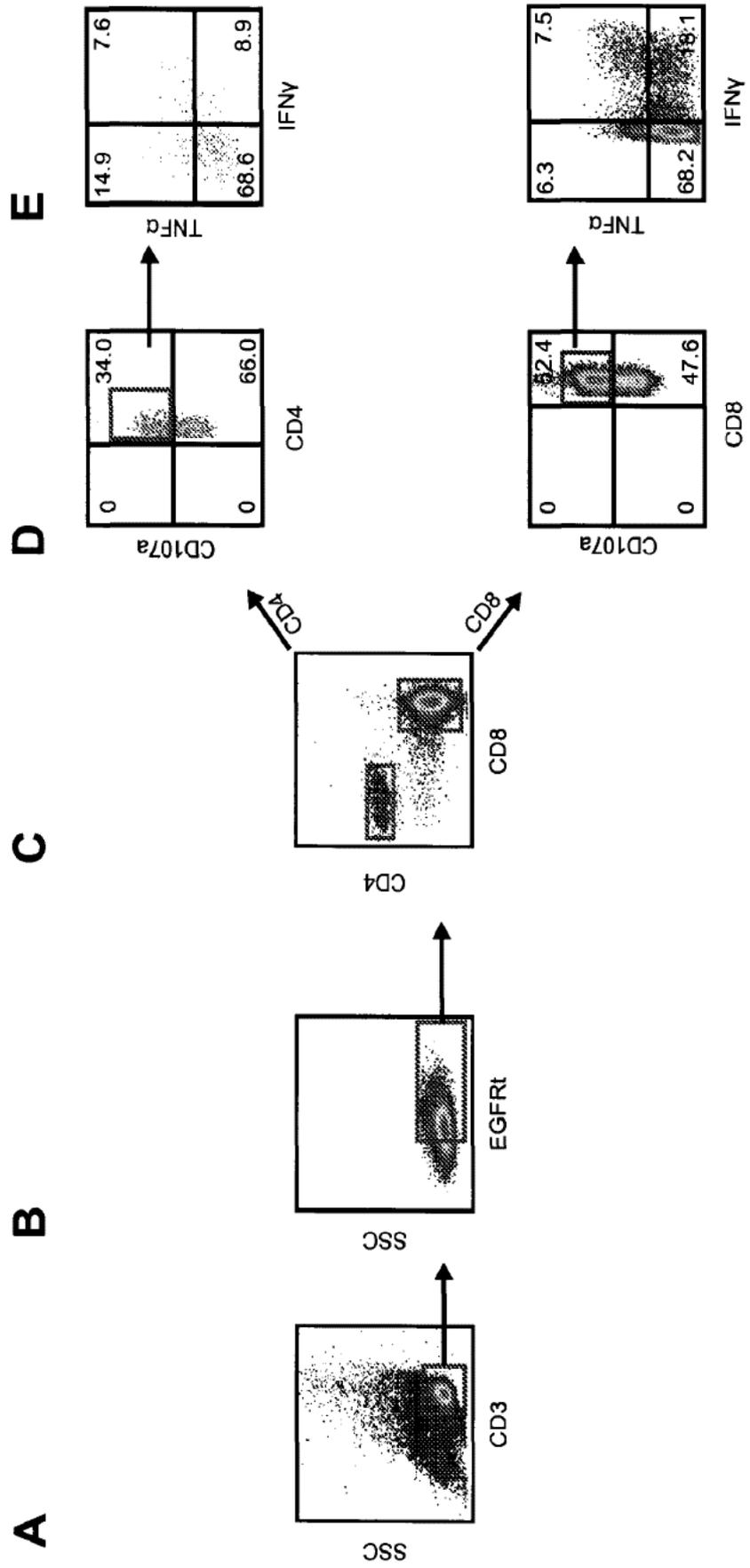
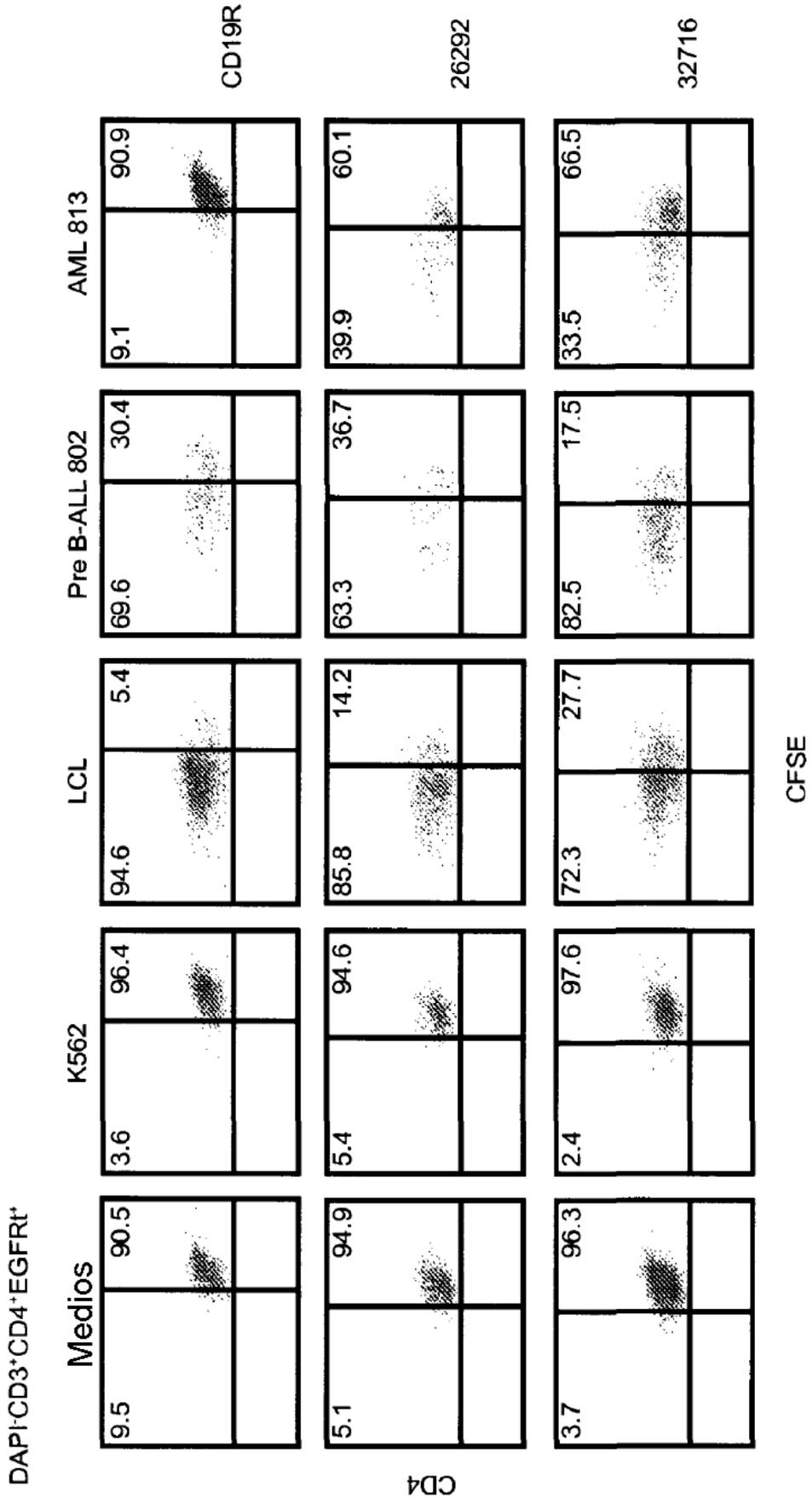


Fig. 15



**Fig. 16A**



**Fig. 16B**

